

091674337
PCT/JP99/02305

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECD 25 JUN 1999
30.04.99
EAJU
WIPO

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 4月30日

REC'D 25 JUN 1999

WIPO PCT

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第137685号

出願人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

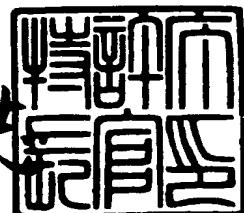
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建



出証番号 出証特平11-3037219

【書類名】 特許願
【整理番号】 PA906235
【提出日】 平成10年 4月30日
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿
【国際特許分類】 C12N
C07K
【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子
【請求項の数】 24
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内
【氏名】 森 敏
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内
【氏名】 樋口 素子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内
【氏名】 鈴木 一矢
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 新機能植物開発学研究室内
【氏名】 西澤 直子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内
【氏名】 中西 啓仁

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668
【弁理士】
【氏名又は名称】 佐伯 憲生
【電話番号】 03-5688-5136

【手数料の表示】

【納付方法】 予納
【予納台帳番号】 039251
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくは他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素。

【請求項2】 オオムギ由来のものである請求項1に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項3】 配列表の配列番号1、3、5、7、9、11又は13に示されるアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項4】 アラビドプシス由来のものである請求項1に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項5】 配列表の配列番号15、17又は19に示されるアミノ酸配列を有する請求項1又は4に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項6】 請求項1から5のいずれかに記載されるニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項7】 遺伝子がcDNAである請求項6に記載の遺伝子。

【請求項8】 配列表の配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示される塩基配列を有する請求項6又は7に記載の遺伝子。

【請求項9】 配列表の配列番号16、18又は20に示される塩基配列を有する請求項6又は7に記載の遺伝子。

【請求項10】 請求項6から9のいずれかに記載の遺伝子を含有してなるベクター。

【請求項11】 ベクターが発現ベクターである請求項10に記載のベクタ一。

【請求項12】 請求項10又は11に記載されたベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項13】 外来遺伝子が、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20に示される塩基配列を有する遺伝子である請求

項12に記載の形質転換体。

【請求項14】宿主が細菌類である請求項12又は13に記載の形質転換体。

【請求項15】宿主が高等植物細胞である請求項12又は13に記載の形質転換体。

【請求項16】請求項12から15のいずれかに記載された形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法。

【請求項17】請求項6から9のいずれかに記載の遺伝子が導入された植物。

【請求項18】種子である請求項17に記載の植物。

【請求項19】請求項17又は18に記載の植物を生育して得られた果実

【請求項20】請求項1から5のいずれかに記載のニコチアナミン合成酵素に対する抗体。

【請求項21】ポリクローナル抗体である請求項20に記載の抗体。

【請求項22】モノクローナル抗体である請求項20に記載の抗体。

【請求項23】植物からニコチアナミン合成酵素を抽出する際に、チオールプロテアーゼ阻害剤の存在下に行なうことを特徴とするニコチアナミン合成酵素を抽出する方法。

【請求項24】チオールプロテアーゼ阻害剤がE-64である請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

【0002】

本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する

抗体に関する。

【従来の技術】

【0003】

ムギネ酸(mugineic acid)を用いて土中の不溶態Fe (III) をキレート化して吸収するいわゆるストラテージII ('Strategy-II') によって鉄を吸収するイネ科植物は、鉄のキレーター(ファイトシデロフォア)を根から分泌し、根圏の鉄を可溶化して吸収する(Roemheld, 1987)。その分泌量は鉄欠乏ストレスにより顕著に増加する。ムギネ酸類は現在までに知られている唯一のファイトシデロフォアである(Takagi 1976)。したがって、イネ科植物の鉄欠乏耐性能はムギネ酸類の分泌量に依存すると考えられている(Takagi et al. 1984, Roemheld and Marschner 1986, Marschner et al. 1987, Mori et al. 1987, Kawai et al. 1988, Mori et al. 1988, Mihashi and Mori 1989, Singh et al. 1993)。

【0004】

植物中でのムギネ酸類の生合成経路を図1に示す。まず、S-アデノシルメチオニン合成酵素によりメチオニンからS-アデノシルメチオニンがつくられる。次いで、ニコチアナミン合成酵素により3分子のS-アデノシルメチオニンが結合して1分子のニコチアナミンが生成される。生成したニコチアナミンは、ニコチアナミンアミノ基転移酵素により3'-ケト体になり、続いてなんらかの還元酵素により2'-デオキシムギネ酸になる。これがさらに水酸化されてムギネ酸をはじめとする他のムギネ酸誘導体になる(Mori and Nishizawa 1987, Shojima et al. 1989, Shojima et al. 1990, Ma and Nomoto 1993)。

図1における右下の化合物のR₁及びR₂が水素原子でR₃が水酸基である化合物がムギネ酸である。R₁が水素原子で、R₂及びR₃が水酸基である化合物が、3-ヒドロキシムギネ酸である。また、R₂が水素原子でR₁及びR₃が水酸基である化合物が3-エピヒドロキシムギネ酸である。

【0005】

オオムギの根から3種のS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が単離されたが、この発現は鉄欠乏で誘導されなかった(Takizawa et al. 1996)。また、オオムギからディファレンシャルクリーニング法により得られた遺伝子I d s 3

はデオキシムギネ酸を水酸化してムギネ酸にする酵素の遺伝子であると推定されるが、この発現は鉄欠乏により強く誘導される(Nakanishi et al. 1993)。さらに、ニコチアナミンアミノ基転移酵素が鉄欠乏オオムギの根から精製・単離され、その2つの遺伝子N_aa t-AとN_aa t-Bが単離された(Takahashi et al. 1997)。このN_aa t-Aの発現も、鉄欠乏で誘導された。

【0006】

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応は、脱炭酸S-アデノシルメチオニンからポリアミンを合成する反応と似ている。しかし、ポリアミン合成酵素と違い、ニコチアナミン合成酵素は3分子のS-アデノシルメチオニンの結合とアゼチジン環の形成を同時に触媒するものである(図1)。このようなニコチアナミン合成酵素は新しい型の酵素である。以前われわれは鉄欠乏オオムギ根からのニコチアナミン合成酵素の部分精製と活性の発現パターンについて報告した(Higuchi et al. 1994, Higuchi et al. 1995, Kanazawa et al. 1995, Higuchi et al. 1996a, Higuchi et al. 1996b)。しかし、ニコチアナミン合成酵素は抽出、精製の途中で非常に分解され易く、分離精製することは困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量を得ることも困難であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素、又は、その一部のアミノ酸が消失、他のアミノ酸で置換、若しくはさらに他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子を含有してなるベクター、及び、当該ベクターで形質転換された形質転換体に関する。

【0009】

本発明は、前記形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子が導入された植物、特にイネ科植物、及び、これらの植物を生育させて得られる果実に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素をチオールプロテアーゼ阻害剤、好ましくはE-64の存在下に抽出する方法に関する。

さらに、本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

【0010】

本発明者らは、以前からニコチアナミン合成酵素の単離を試みてきたが(Higuchi et al. 1994)、本酵素は非常に分解され易く、単離精製が非常に困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量すら得ることが困難であった。その後、チオールプロテアーゼの阻害剤であるトランス-エポキシサクシニル-ロイシルアミドー(4-グアニジノ)ブタン(trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane(以下、E-64と略す))E-64によって本酵素の分解が強く抑制されることがわかつてきた(Higuchi et al. 1996a)。

今回、液体窒素中で細かい粉状になるまで粉碎した根を、0.1 mMのチオールプロテアーゼ阻害剤E-64を含む抽出バッファーと速やかに混合するようにしたところ、ニコチアナミン合成酵素タンパク質を単離することができ、その遺伝子も単離することができた。

【0011】

さらに、本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復するが、その回復の程度はかなり低く(Higuchi et al. 1994)、SDS-PAGEを行う前にさらに精製度を上げておく必要があった。そこでカラムクロマトグラフィーの方法についても改善が行なわれた。

また、本発明者らは、本発明の酵素は疎水性が比較的高いため、温和な界面活性剤であるCHAPSをバッファーに加えることにより、分離能が上昇することを見出した。陰イオン交換クロマトグラフィー担体を何種類か試したところ、D

EAEセファロースFFとDEAEセファセルがもっとも効果的であった。

TSKゲル・ブチルトヨパール 650Mに加えて、同じく疎水クロマトグラフィー担体であるTSKゲル・エーテルトヨパール 650Mが30~35kDaの不純物を取り除くために効果的であった。

【0012】

本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復する30~35kDaのペプチドであることが報告されているが、活性は30~35kDaの間の広い分子量の範囲で検出されていた（図3参照）。図3は、酵素活性を有する分画における分取SDS-PAGEの結果を示す。SDS-PAGEは、11%アクリルアミドスラブゲルで行った。ゲルの一部をクマシーブリリアンドブルーで染色し、残りを銅染色し30~35kDaを7つに切り分けた（短い線で切った場所を表示）。図3の横棒は、各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したものである。

そこで、これらの分子量を有する蛋白質のなかから、ニコチアナミン合成酵素ペプチドを同定するために、鉄欠乏、及び、対照となるオオムギのそれぞれの根から精製したニコチアナミン合成酵素画分に含まれるペプチドをSDS-PAGEを用いて比較した。それぞれのオオムギの根200gから、後述する実施例3に記載の方法に従い本酵素を精製した。

【0013】

対照の酵素活性は鉄欠乏の1/4であった。

本発明の酵素を精製する各段階の活性画分のペプチド組成をSDS-PAGEで比較したものを、図2に示す。図2は、鉄欠乏のオオムギの根200gからの精製過程（図中（-）で示す）と、対照のオオムギの根200gからの精製過程（図中（+）で示す）との比較を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲル（Laemmli, 1970）で行った。ゲルは、クマシーブリリアンドブルーで染色した。図2の（A）は、DEAEセファロースの前の段階のもので、上段は鉄欠乏のオオムギの根からのものを示し、下段は対照の根からのもので、各レーンの、レーン1は粗抽出物200μgのものを、レーン2はブチルトヨパール650M後のもの100μgのものを、レーン3はヒドロキシルアルトヨパール650M後のものを示す。

パタイト後のもの $20 \mu\text{g}$ のものを、レーン4はブチルトヨパール650M後のもの $15 \mu\text{g}$ のものを示している。図2の(B)は、DEAEセファロースFF後のもので、各レーン $25 \mu\text{g}$ のものである。図2の(C)は、エーテルトヨパール650M後のもので、左側は不活性分画を、右側は活性分画を示し、各画分の $1/25$ を泳動させたものである。

【0014】

この結果から、DEAEセファロースの前の段階までは鉄欠乏、および対照とでほとんど違いは見られなかった(図2のA参照)。DEAEセファロース後、 30 および 31kDa のペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかった(図2のB参照)。エーテルトヨパール後、 31kDa ペプチドは活性画分から除かれた。新たに 32 および 33kDa のペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかる(図2のC参照)。 32 および 33kDa ペプチドからは活性が検出されたが、 30kDa ペプチドからは検出されなかった(図3参照)。

【0015】

次に、本発明の酵素の分子量をゲルろ過により決定した。

ニコチアナミン合成酵素のゲルろ過により推定された分子量は、 $40,000$ ~ $50,000$ であると報告されている(Higuchi et al. 1994)。しかし、これはSDS-PAGEによる値と一致していなかった。

今回、本発明者らは、バッファーにCHAPSを加えてゲルろ過を行ったところ分離能が上昇し、本酵素の分子量は $35,000$ と推定された(図4参照)。これは、以前にSDS-PAGEにより推定された値とよく一致した。

【0016】

図4は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターンを示す。黒丸は酵素活性を示し、実線は 280nm の吸光度を示す。ヒドロキシルアパタイト後の活性画分を、展開バッファー(50mM Tris, 1mM EDTA, 0.1M KCl, 0.05% CHAPS, 0.1mM p-APMSF, 3mM DTT, pH 8.0)で平衡化したセファクリルS300HR(ファルマシア社)カラム($1.5 \text{cm} \times 71 \text{cm}$, 125ml)に通した。分子量マーカーは、チログロブリン($\text{Mr } 670,000$)、 γ -グロブリ

ン (M_r 158,000)、オブアルブミン (M_r 44,000)、ミオグロビン (M_r 17,000) を用いた。線流速 10 cm/hr で展開した。

【0017】

精製したニコチアナミン合成酵素から部分アミノ酸配列を決定した。

1 kg の鉄欠乏オオムギの根より、後述する実施例3の方法を用いて、前述した 30 kDa、32 kDa、および 33 kDa のペプチドを精製した。これらを後述する実施例4の方法を用い部分分解した。32 と 33 kDa のペプチドは完全には分離できなかったが、配列は互いによく似ているかあるいは 32 kDa は 33 kDa の分解物であると仮定して一緒に分解した。

決定した部分配列からこれらのペプチドは互いによく似ていることがわかった(図5)。また、33、32 kDa (1) 断片は分解前の分子量とほとんど変わらない分子量であったのでこの配列が本酵素のN末端領域であると思われた。コンピューター検索によりこれらの配列とよく似た配列を持つ機能未知の遺伝子がイネ、およびシロイヌナズナにあることがわかった。特にイネのEST-cDNA A クローン D23792 と D24790 は、前者については 33 アミノ酸残基の重なりのうち 80.0% が同一のアミノ酸、後者については 19 アミノ酸残基の重なりのうち 68.4% が同一のアミノ酸で非常によく似ていた(図5)。

図5は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した6つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。PCRに使用したプライマーの配列は矢印で示した部分の塩基配列を利用した。

【0018】

次いで、ニコチアナミン合成酵素 cDNA のクローニングとその塩基配列を決定した。

前述した方法で得られた部分アミノ酸配列からデジエネレイトプライマーを合成し、鉄欠乏オオムギ根由来の cDNA に対して PCRを行ったが、目的の DNA は増幅されてこなかった。そこでイネの D23792 と D24790 の配列から、单一の塩基配列を持つプライマー(図5中に矢印で表示)を合成して PCRを行った。NF および NR プライマーを用いた PCR で 205 bp の断片が、I

FおよびI Rプライマーを用いたPCRで274 bpの断片が増幅され、これらは目的の配列を含んでいた。205 bpの断片をプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ(A)⁺RNA由来のcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ19個のクローンが、274 bpの断片をプローブとしてスクリーニングしたところ88個のクローンが得られた。

【0019】

得られたクローンのうちNAS1と名付けたものは、985 bpの翻訳領域を含みそこから推定されるアミノ酸配列は328アミノ酸残基で、推定分子量35,144であった。この値はSDS-PAGEやゲルろ過から推定された値とよく一致した。32および33kDaペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てNAS1中に含まれていた(図6)。

図6は、NAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図5の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

予想されるpIは、5.2で未変性等電点電気泳動による値と一致した。NAS1の他に極めてよく似た配列を持つ6個のクローンNAS2、NAS3、NAS4、NAS5-1、NAS5-2、NAS6が得られた(表1、図7)。

図7は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印はNAS5-1及び5-2以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図5の部分配列と一致した部分を示している。

これらのクローンの塩基配列を配列番号2(NAS1)、配列番号4(NAS2)、配列番号6(NAS3)、配列番号8(NAS4)、配列番号10(NAS5-1)、配列番号12(NAS5-2)、配列番号14(NAS6)にそれぞれ示す。また、これらのアミノ酸配列を配列番号1(NAS1)、配列番号3(NAS2)、配列番号5(NAS3)、配列番号7(NAS4)、配列番号9(NAS5-1)、配列番号11(NAS5-2)、配列番号13(NAS6)にそれぞれ示す。

【0020】

【表1】

nas クローンの性質

クローン	アミノ酸 数	分子量	p I	nas1との 相同性(%)	nas2との 相同性(%)	nas4との 相同性(%)
nas1	328	35144	5.20	—		
nas2	336	35839	5.07	72	—	
nas3	336	36013	5.47	72	95	
nas4	330	35396	4.91	73	89	—
nas5-1	268	28802	5.32	57	58	56
nas5-2	283	30148	5.22	61	61	59
nas6	329	35350	5.07	74	89	88

【0021】

30 kDaペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てNAS5に含まれていた。これらのクローンの5'および3'非翻訳領域は互いに似ていなかった。ただしNAS5-1とNAS5-2は、NAS5-2の122~140アミノ酸残基の部分以外は全く同一であった。NAS5-1はNAS5-2の一部が欠損したものと思われるが、これが植物体中で起こったことなのか実験中に起こったことなのかは現在不明である。

イネのニコチアナミン合成酵素類似物D23792とD24790は、NAS1と約80%の相同性を示した。シロイヌナズナのAC003114とAB005245はNAS1と約45%の相同性を示した。

アラビドブシス（シロイヌナズナ）のゲノムDNAに対して、図に下線で示し

た配列のプライマーを用いたPCRを行い、シロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素遺伝子を3つ得た。これをAtNAS-1、AtNAS-2、AtNAS-3とした。

これらの遺伝子の塩基配列を配列番号16(AtNAS-1)、配列番号18(AtNAS-2)、配列番号20(AtNAS-3)にそれぞれ示す。また、これらのアミノ酸配列を配列番号15(AtNAS-1)、配列番号17(AtNAS-2)、配列番号19(AtNAS-3)にそれぞれ示す。

【0022】

得られたNAS1のタンパク質を大腸菌で発現させた。

NAS1のORFをPCRで増幅しベクターpMAL-c2にクローニングして、NAS1がマルトースバイオインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。融合タンパク質はIPTGにより発現が強く誘導される。

これを用いて形質転換した大腸菌(E. coli)から粗抽出物を得、融合タンパク質の状態でニコチアナミン合成酵素活性を測定したところ、ベクターのみでは全く活性は検出されなかったが、NAS1のORFを導入した場合には活性が検出された。結果を図8に示す。

図8は、マルトースバイオインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した結果を示すものである。図8のレーン1は、標準ニコチアナミド(NA)であり、レーン2はマルトースバイオインディングプロテイン(SAM)のみを発現している大腸菌のものであり、レーン3はマルトースバイオインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌のものである。

【0023】

後述の実施例7で述べる方法によりノーザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、この遺伝子は鉄欠乏の根で強く誘導されていた(図9)。これは本酵素活性の発現パターンと一致していた(Higuchi et al. 1994)。図9は、NAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。全RNAを、鉄欠乏処理開始後1週間のものと、対照のオオムギの葉と根から抽出し、各レーンに5μgのRNAを泳動した。

【0024】

また、後述の実施例8で述べる方法によりサザンハイブリダイゼーション解析を行った。BamHIあるいはEcoRIあるいはHindIIIでDNAを断片化したところ複数の断片が検出されたが、現在得られているどのクローンもBamHIおよびEcoRIでは切断されないので、ニコチアナミン合成酵素遺伝子はオオムギおよびイネのゲノム中で複数コピー存在するものと思われた(図10)。

図10は、NAS1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。オオムギとイネの葉から抽出したゲノムDNAをBamHI(レーンB)、EcoRI(レーンR)、HindIII(レーンH)で断片化し、各レーンに10μgを泳動した。

【0025】

さらに、後述する実施例9に述べた方法により調製した抗体を用い、実施例10で述べる方法によりウエスタンプロット解析を行った。本酵素活性を検出するために調製した粗抽出物中では、本酵素タンパク質は操作中に速やかに分解されることがわかった(図11)。この染色パターンは本酵素活性がSDS-PAGE後に30~35kDaの間に広がって検出されること(図3参照)と一致した。

図11は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンプロット解析の結果を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲルで行った。100μgのタンパク質を泳動した。

【0026】

後述する実施例10に述べる方法によりタンパク質を変性させて得られた粗抽出物中では、35~36kDaのほぼ单一のバンドとして検出された(図12)。この値はアミノ酸配列から予想された値とよく一致した。

図12は、トリクロロ酢酸/アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンプロット解析の結果を示す。SDS-PAGEは12.5%アクリルアミドスラブゲルで行った。100μgのタンパク質を泳動した。根については200μg、葉については500μgのタンパク質を泳動した。

2次元電気泳動を行った後ウエスタンプロット解析を行ったところ数個のスポ

ットが検出された。このことは複数のニコチアナミン合成酵素遺伝子が得られたことと一致していた。どのスポットも鉄欠乏の根で誘導されていた。

【0027】

ムギネ酸類の分泌量は根乾燥重量1gあたり1日に20mgに達する(Takagi 1993)。われわれが検出した粗精製ニコチアナミン合成酵素活性はこれをまかなく足りるものであった。本酵素タンパク質が数種類以上存在していること、および活性のない30kDaペプチドが存在していることから、これらのペプチドが会合することにより、3分子のS-アデノシルメチオニンを結合するのに適した構造となり最大の活性を示す、ということも考えられる。しかしゲルろ過により推定された分子量は35,000であった(図4)。

また、サブユニットが再会合したことによる活性の上昇は現在までのところ観察されていない。さらにマルトースバインディングプロテインとの融合タンパク質の状態でも活性を示したことから、本発明者らは、今のところ本酵素は単量体であると考えている。しかしながら、多量体を形成してより大きな活性を示すという可能性が完全に否定されているわけではない。

【0028】

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応機構は、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とするメチル基転移反応や、脱炭酸S-アデノシルメチオニンからスペルミジンやスペルミンを合成する反応と似ていると思われる。これらの酵素に共通の触媒部位についてはタンパク質の高次構造中の等価なアミノ酸残基の配置の類似性が論じられている(Hashimoto et al. 1998, Schluckebier et al. 1995)。

将来、他の植物種のニコチアナミン合成酵素とのアミノ酸配列の比較やX線結晶構造解析から触媒部位が明らかになるであろう。

【0029】

鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導はイネ科植物に特有の現象であり、ムギネ酸類の大量生合成のために必須である。イネは主要なイネ科作物の中でムギネ酸類の分泌量がもっとも少なく、石灰質土壌での鉄欠乏に非常に弱い。したがって、本発明のニコチアナミン合成酵素の遺伝子をイネ科植物、特に

イネに導入し、鉄欠乏時に大量に発現させるようにして鉄欠乏耐性のある形質転換イネを作出することにより、石灰質土壌でのイネの栽培が可能となる。

イネ科植物においてはこれまで、ニコチアナミンはムギネ酸類を合成する前駆体としての役割しか考えられていなかったが、本発明によりニコチアナミン合成酵素の遺伝子は多重遺伝子族を形成していることが明らかになったことから、イネ科植物においても他に重要な役割をはたしていることが考えられる。

【0030】

イネ科以外のムギネ酸類を分泌しない植物では、ニコチアナミンは体内で、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} といった2価金属陽イオンのキレーターとして働き、これらの金属の恒常性の維持に貢献するのではないかといわれており (Stephan et al. 1994) 、イネ科植物でも同様の役割をはたしていることが考えられる。

また、ニコチアナミン合成酵素活性は双子葉植物では、鉄欠乏により誘導されず、本発明の遺伝子の発現も鉄欠乏で誘導されないものと思われる。本発明者らは、シロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素遺伝子をクローン化している。これらの遺伝子のプロモーター領域を比較することにより鉄欠乏による遺伝子発現の機構が明らかにされることにより、本発明の遺伝子がイネ科植物のみならず、双子葉植物においても重要な機能を果たすことになるであろう。

【0031】

配列表の配列番号1に本発明のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するもののみならず、ニコチアナミン合成酵素の活性を失わない限り、これらのアミノ酸配列の一部、好ましくは全アミノ酸の50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは10%以下のアミノ酸が欠失してもよいし、他のアミノ酸で置換されていてもよいし、若しくは、他のアミノ酸が更に付加していくてもよいし、又は、これらの欠失、置換、付加が組み合わされていてもよい。

【0032】

また、配列表の配列番号2に本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする塩

基配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子は、配列番号2に示される塩基配列を有するもののみならず、前記したニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子を包含するものである。

【0033】

本発明の前記遺伝子を導入するベクターとしては、特に制限はないが、種々のベクターに導入することが可能である。好ましいベクターとしては発現ベクターが挙げられる。

本発明の組換えベクターを用いて種々の細胞を常法に従って形質転換することができる。得られた形質転換体を用いてニコチアナミドを大量に製造することができる。これらの方法は当業者によく知られている方法により行うことができる。

【0034】

本発明の前記遺伝子を導入する宿主としては、各種の細菌類、酵母、細胞類などが挙げられる。好ましくは、植物が挙げられ、特にイネ科植物が好ましい。

遺伝子を導入する方法としては、特に制限はなく、ベクターを使用してもよいし、ゲノムに直接導入してもよい。

【0035】

本発明のニコチアナミン合成酵素に対する抗体は、常法により本発明のニコチアナミン合成酵素を用いて製造することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもよく、必要ならば、モノクローナル抗体とすることもできる。

【0036】

さらに、本発明の遺伝子を用いて、植物、好ましくはイネ科植物の品種の改良を行うこともできる。特に、鉄分が欠乏している土壤においても生育できる品種に改良するために、本発明の遺伝子を利用することができる。

【0037】

【実施例】

以下に本発明をより具体的に説明するたに実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0038】

実施例1（植物材料の調製）

オオムギ(*Hordeum vulgare L.* cv エヒメハダカ1号)を湿らせた濾紙の上で発芽させてから標準的な水耕液 (Mori and Nishizawa 1987) を用いて自然光のもと、空調設備のない温室で成育させた。水耕液のpHは、0.5N HClを用いて毎日5.5に合わせた。第3葉が展開したとき鉄を除いた水耕液に移した。水耕液のpHは、0.5N NaOHを用いて毎日7.0に合わせた。対照区は引き続き標準的な水耕液で成育させた。水耕液は1週間に1回更新した。鉄欠乏処理開始後2週間以降に第4、5葉に顕著に鉄欠乏クロロシス症状が現れたところで根を採取し、液体窒素で瞬間に凍結させ、-80°Cで使用時まで保管した。

【0039】

実施例2（ニコチアナミン合成酵素活性の測定）

すでにわれわれが発表した測定方法(Higuchi et al. 1996a)を改善した方法を用いた。酵素液を反応バッファー(50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM デチオスレイトール(dithiothreitol) (以下、DTTと略す)、10 μM (P-アミジノフェニル)メタンスルホニルフルオライド((p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride) (以下、p-APMSFと略す)、10 μM トランス-エポキシサクシニル-ロイシルアミドー(4-グアニジノ)ブタン(trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane) (以下、E-64と略す)、pH 8.7)でバッファー交換した。バッファー交換には限外ろ過フィルターユニット、ウルトラフリーC3LGC NMWL10000(ミリポア社)を用いた。カルボキシリ基が¹⁴Cで放射能標識されたS-アデノシルメチオニン(アマシャム社)を、終濃度20 μMとなるように添加し、15分間25°Cに保った。反応生成物をシリカゲルLK6(ワットマン社)を用い展開溶媒(フェノール:n-ブタノール:ギ酸:水=12:3:2:3)で薄層クロマトグラフィーにて分離した。反応生成物の放射活性はイメージアナライザ-BAS-2000(フジフィルム社)で検出した。タンパク質量はブラッドフォード法によるプロテインアッセイキット(バイオラッド社)を用いて測定した。

【0040】

実施例3 (ニコチアナミン合成酵素の精製)

以下の操作はすべて4℃で行い、ニコチアナミン合成酵素を含む画分には終濃度 $10\mu M$ となるようにE-64を添加した。

凍結した根を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、根100gあたり200mlの抽出バッファー(0.2M Tris, 10mM EDTA, 5% (v/v) グリセリン(glycerol), 10mM DTT, 0.1mM E-64, 0.1mM p-APMSF, 5% (w/v) 不溶性ポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone)(PVP), pH 8.0)を加えて家庭用ジューサーミキサーを用いて混合した。これを、22, 500×g 30分間で遠心分離し上清を得た。これに硫酸アンモニウムを終濃度0.4Mとなるように加え、1時間静置した。再度22, 500×g 30分間で遠心分離し上清を得た。

【0041】

TSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラム(東ソー社、根100gあたりカラム体積10ml)を吸着バッファー(20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.4M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1mM p-APMSF, pH 8.0)で平衡化したものに遠心分離上清を通しニコチアナミン合成酵素を吸着させ、溶出バッファー(10mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, 5%グリセリン(glycerol), 0.05%3-[3-クロラミドプロピル]ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸(3-[3-cholamidopropyl] dimethyl-ammonio] propanesulfonic acid) (以下、CHAPSと略す), pH 8.0)で溶出した。

【0042】

このニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分に、塩化カリウムを終濃度10mMとなるように、1Mリン酸カリウムバッファー(pH 8)を終濃度1mMとなるように加えた。吸着バッファー(1mM K-P, 10mM KC1, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, pH 8.0)で平衡化したヒドロキシルアパタイト100~350メッシュ(ナカライト社)をタンパク質100mgあたり10ml用意し、これにニコチアナミン合成酵素を含む画分を通してした。ニコ

チアナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。

この素通り画分をすでに述べたようにTSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラム（タンパク質10mgあたりカラム体積1ml）に吸着させ、ニコチアナミン合成酵素を溶出した。

吸着バッファー（20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, 0.05% CHAPS, pH 8.0）で平衡化したDEAEセファロースFFカラム（ファルマシア社、タンパク質25mgあたりカラム体積5ml）にこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分を通し、塩化カリウム濃度0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2Mで段階溶出した。ニコチアナミン合成酵素は0.15Mで溶出された。

【0043】

TSK ゲル・エーテルトヨパール650Mカラム（東ソー社、根100gあたりカラム体積10ml）を吸着バッファー（20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 1.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1mM p-APMSF, pH 8.0）で平衡化したものにこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分を通した。ニコチアナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。これをそのまままで述べたようにTSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラムに吸着させ、ニコチアナミン合成酵素を溶出した。

以上のカラムクロマトグラフィーにより精製されたニコチアナミン合成酵素を含む画分中のペプチドをさらに、11%アクリルアミドゲルを用いてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下SDS-PAGEと略す）により分離した。SDS-PAGE終了後、ゲルを0.3M 塩化銅で染色し（Dzandu et al. 1988）分離したペプチドのバンドを切りだした。このゲル片を0.25M EDTA/0.25M Tris（pH 9.0）で脱色し、抽出バッファー（1% SDS, 25mM Tris, 192mM グリシン(glycine)と共にすりつぶした。これをSDSを含まないバッファー（25mM Tris, 192mMグリシン(glycine)）を用いて電気抽出し、ペプチドを回収した。

【0044】

実施例4（部分アミノ酸配列の決定）

単離したニコチアナミン合成酵素を、臭化シアンを用いて化学分解した (Gros s 1967)。

SDS-PAGE終了後、ニコチアナミン合成酵素を含むゲル片に10倍体積の70% (v/v) ぎ酸、1% (w/v) 臭化シアンを加え4°Cで1晩かけて分解した。分解終了後、液体部分を回収し、減圧乾固した。これをSDS-PAGE用試料バッファーに溶かし、1晩室温においてトリシンを含む16.5% アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE (Schagger and Jagow, 1987) で、分解産物を分離した。泳動終了後PVDF膜にペプチドを転写し (Towbin et al. 1979) アミドブラックで染色した。染色されたバンドを切り分け、エドマン分解気相シーケンサー(モデル492Aプロテインシーケンサー、アプライドバイオシステムズ社)により、各ペプチドのN末端側からアミノ酸配列を決定した。

【0045】

実施例5（ニコチアナミン合成酵素遺伝子のクローニング）

得られた部分アミノ酸配列に基づいて合成したプライマーを用い、鉄欠乏オオムギ根由来のcDNAに対してPCRを行った。得られたDNA断片をランダムプライマーキット(宝酒造)により [α -³²P] dATPで放射能標識したものをプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ(A)⁺RNAから調整したpYH2-3 cDNAライブラリーをスクリーニングした。単離したcDNAクローンについてサイクルシークエンシングキット(島津分光)および島津DNAシーケンサーDSQ-1000Lを用いて塩基配列を決定した。

シロイヌナズナのAC003114とAB005245の塩基配列に基づいて合成したプライマーを用い、シロイヌナズナのゲノムDNAに対してPCRを行った。得られたDNA断片についてサイクルシークエンシングキット(島津分光)および島津DNAシーケンサーDSQ-1000Lを用いて塩基配列を決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号2に示す。

【0046】

実施例6 (N A S 1 タンパク質の大腸菌での発現)

PCRにより、N A S 1 cDNAの最初のATGの上流にEcoRIサイトを、終止コドンの下流にPstIおよびBamHIサイトを導入した断片を増幅した。まず得られた増幅産物をEcoRIサイトとBamHIサイトを用いてpBluescript II SK-にサブクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した。次にEcoRIサイトとPstIサイトを用いてpMAL-c2にクローニングし、N A S 1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。

【0047】

この融合タンパク質を発現させる宿主として大腸菌(E.coli strain XL1-Blue)を用いた。pMAL-c2-NAS1とpMAL-c2をそれぞれXL1-Blueに導入しアンピシリンとテトラサイクリンをそれぞれ50μg/ml含むLB培地でOD600が0.5になるまで37℃で培養した。イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、終濃度0.3mMとなるように添加し、引き続き37℃で培養し3時間後に集菌した。菌体を0.2M NaCl, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.1mM E-64を含む10mMトリスバッファーpH7.4に懸濁し液体窒素で凍結した。これを氷水中で融解し15秒間の超音波処理を10回行った。得られた粗抽出物のニコチアミン合成酵素活性を実施例2で述べた方法で測定した結果、酵素活性が確認された。

【0048】

実施例7 (ノーザンハイブリダイゼーション)

N A S 1 cDNAを、HindIIIとNotIで切断したDNA断片を[α -³²P]dATPで放射能標識したものをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。オオムギから全RNAを抽出し(Naito et al. 1988)、1.4%アガロースゲル電気泳動により分離した後、ハイボンド-N⁺膜(アマシャム社)に転写した。膜を0.5Mチャーチリン酸(Church and Gilbert 1984), 1mM EDTA, 7% (w/v) SDS, 100μg/mlサケ精巣DNAを含むバッファーを用いて65℃1晩でプローブとハイブリダイズした。こ

れを40 mMチャーチリン酸、1% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65°C 10分間洗浄した。この洗浄をもう1回行った後、0.2×SSPE、0.1% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65°C 10分間洗浄した。放射活性はイメージアナライザーBAS-2000で検出した。

結果を図9に示す。

【0049】

実施例8（サザンハイブリダイゼーション）

オオムギとイネの葉からそれぞれゲノムDNAを抽出した。これをBamHI、あるいはEcoRI、あるいはHindIIIで断片化し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動で分離した後、ハイボンド-N⁺膜（アマシャム社）に転写した。実施例7で述べた方法でハイブリダイズし、放射活性を検出した。

結果を図10に示す。

【0050】

実施例9（ポリクローナル抗体の調製）

ネズミ2匹を約100 μgの単離したニコチアナミン合成酵素を抗原として免疫した。抗原としては部分アミノ酸配列を決定したものと同じ試料を用いた。1回目の免疫時には完全フロイントアジュvant、2回目以降は不完全フロイントアジュvantを用いた。4回免疫した後、全採血を行い、血清を-80°Cで保存した。

【0051】

実施例10（ウエスタンプロット解析）

トリクロロ酢酸とアセトンを用いて全タンパク質を抽出した(Damerval et al. 1986)。植物体を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、10% (w/v) トリクロロ酢酸、0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール(2-mercaptopethanol)を含むアセトンと混合した。-20°Cで1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000×g 30分遠心して沈殿を回収した。沈殿を0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール(2-mercaptopethanol)を含むアセトンに懸濁し、-20°Cで1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000×g 30分遠心して沈殿を回収した。沈殿を減圧乾燥した後、試料バッファー (9.5

M尿素(urea), 2% (w/v) トリトン-X-100 (Triton X-100), 5% (v/v) 2-ME) に溶かし、16,000×g 10分遠心して上清を得た。これに含まれるタンパク質を SDS-PAGE、あるいは変性2次元電気泳動(O'Farrell 1975)で分離した後、PVDF膜に転写した。この膜に対して、実施例9で調製した抗ニコチアナミン合成酵素抗体を1次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗体(和光純薬)を2次抗体として、ジアミノベンジンで発色しウエスタンプロット解析を行った。

結果を図12に示す。SDS-PAGEは12.5%アクリルアミドスラブゲルで行った。100μgのタンパク質を泳動した。根については200μg、葉については500μgのタンパク質を泳動した。

【0052】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：328

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Ile Glu Lys Ile	15
Ala Gly Ile Gln Ala Ala Ile Ala Glu Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Glu Val Asp Arg Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ser Pro Glu His	60
Gln Arg Met Arg Glu Ala Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Thr Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Leu Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Val Asn Leu Ser Arg Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg His Val	120
Pro Gly Ile Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro	135

Leu Pro Phe Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala His His His Leu Pro Glu	150
Thr Gln Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Glu Arg	165
Ala Arg Lys Leu Phe Gly Ala Thr Ala Asp Gly Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Gln Glu Leu	195
Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Glu Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met	225
Val Glu Gly Ala Ser Leu Val Val Arg Ser Ala Arg Pro Arg Gly	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Ile Arg Arg Gly Gly	255
Phe Glu Val Leu Ala Val His His Pro Glu Gly Glu Val Ile Asn	270
Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala Gln Leu Ser Gly	285
Pro Gln Asn Gly Asp Ala His Ala Arg Gly Ala Val Pro Leu Val	300
Ser Pro Pro Cys Asn Phe Ser Thr Lys Met Glu Ala Ser Ala Leu	315
Glu Lys Ser Glu Glu Leu Thr Ala Lys Glu Leu Ala Phe	328

配列番号：2

配列の長さ：1295

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CGGTTTCAGAG	GCTTCCAGAG	TTCTTCCGGT	CACCAAGAAG	CATTTGATCA	TAACATGGAT

70	80	90	100	110	120
GCCCCAGAACAA	AGGAGGGTCGG	TGCTCTGATC	GAGAAGATCG	CCGGTATCCA	GGCCGCCATC

130	140	150	160	170	180
GCCGAGCTGC CGTCGCTGAG CCCGTCCCCC GAGGTCGACA GGCTCTTCAC CGACCTCGTC					
190	200	210	220	230	240
ACGGCCTGCG TCCCGCCGAG CCCCGTCGAC GTGACGAAGC TCAGCCCGA GCACCAGAGG					
250	260	270	280	290	300
ATGCGGGAGG CTCTCATCCG CTTGTGCTCC GCCGCCGAGG GGAAGCTCGA GGCGCACTAC					
310	320	330	340	350	360
GCCGACCTGC TCGCCACCTT CGACAACCCG CTCGACCACC TCGGCCTCTT CCCGTACTAC					
370	380	390	400	410	420
AGCAACTACG TCAACCTCAG CAGGCTGGAG TACCGAGCTCC TGGCGCGCCA CGTGCCGGC					
430	440	450	460	470	480
ATCGCGCCGG CGCGCGTCGC CTTCGTCGGC TCCGGCCCGC TGCCGTTTAG CTCGCTCGTC					
490	500	510	520	530	540
CTCGCCGGCG ACCACCTGCC CGAGACCCAG TTCGACAACT ACGACCTGTG CGGCGCGGCC					
550	560	570	580	590	600
AACGAGCGCG CCAGGAAGCT GTTCGGCGCG ACGGCGGACG GCGTGGCGC GCGTATGTCG					
610	620	630	640	650	660
TTCCACACGG CGGACGTCGC CGACCTCACC CAGGAGCTCG GCGCCTACGA CGTGGTCTTC					
670	680	690	700	710	720
CTCGCCGGCG TCGTCGGCAT GGCAGCCGAG GAGAAGGCCA AGGTGATTGC CCACCTGGGC					

特平10-137685

730 740 750 760 770 780
GCGCACATGG TGGAGGGGGC GTCCCTGGTC GTGC GGAGCG CACGGCCCCG CGGCTTTCTT

790 800 810 820 830 840
TACCCCATTG TCGACCCGGA GGACATCAGG CGGGGTGGGT TCGAGGTGCT GGCGTGCAC

850 860 870 880 890 900
CACCCGGAAAG GTGAGGTGAT CAACTCTGTC ATCGTCGCCCG GTAAGGCCGT CGAACGCCAG

910 920 930 940 950 960
CTCAGTGGGC CGCAGAACGG AGACGCGCAC GCACGGGGCG CGGTGCCGTT GGTCA GCCCCG

970 980 990 1000 1010 1020
CCATGCAACT TCTCCACCAA GATGGAGGCG ACCGCGCTTG AGAAGAGCGA GGAGCTGACC

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GCCAAAGAGC TGGCCTTTG ATTGAAGAGT GCGCGTGGTC ATTCTGTCGC CTGCGATCGT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGTAACCTTC CTACTCGTGT GTGTTTGAT GTTTGTGCCT GTAAGAGTTA TGCTTCCGGC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTTGTGCTGT TAATTTACAC GCGTTACATG TAGTACTTGT ATTTATAACCT GGAATAACGG

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TATGTAACAT AAATATTAGT GGGATTGAA GTGTAATGCT AAATAATAAG AAAACTTGAT

1270 1280 1290 1300 1310 1320

GCAGACATTC AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAA....

配列番号：3

配列の長さ：335

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Ala Ala Gln Asn Asn Gln Glu Val Asp Ala Leu Val Glu Lys	15
Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser	30
Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr Ala	45
Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu	60
Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala	75
Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe	90
Asp Lys Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn	105
Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr	120
Val Pro Gly Gly Tyr Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser	135
Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu	150
Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn	165
Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Arg Asp Val Gly Ala	180
Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Gly Glu	195
Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met	210
Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His	225
Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala	240
Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg	255
Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val	270

Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Val His Ala	285
Asp Gly Leu Gly Ser Gly Arg Gly Ala Gly Gly Gln Tyr Ala Arg	300
Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met	315
Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn	330
Ala Glu Val Ala Phe	335

配列番号：4

配列の長さ：1342

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CTCCTGTGCC TGTCTGAGG TACCAAGAAC ACCAGTGAAA TGGCTGCCA GAACAACCAG					
70	80	90	100	110	120
GAGGTGGATG CCCTGGTGG A AAGATCACCC GGGCTCCATG CCGCAATCGC CAAGCTGCCG					
130	140	150	160	170	180
TCGCTCAGCC CATCCCCGGA CGTCGACGCG CTCTTCACGG AGCTGGTCAC GGCGTGCCTT					
190	200	210	220	230	240
CCACCGAGTC CAGTGGACGT GACCAAGCTC GGGCCGGAGG CGCAGGAGAT GCGGGAGGGC					
250	260	270	280	290	300
CTCATCCGCC TATGCTCCGA GGCGAGGGG AAGCTGGAGG CGCACTACTC CGACATGCTC					

310	320	330	340	350	360
GCCGCCTTCG ACAAGCCGCT GGATCACCTC GGCATGTTCC CCTACTACAA CAACTACATC					
370	380	390	400	410	420
AACCTCAGCA AGCTCGAGTA CGAGCTCCTG GCCCGCTACG TGCCTGGCGG CTATGCCCG					
430	440	450	460	470	480
GCGCGCGTCG CGTTCATCGG CTCCGGCCCG CTGCCGTTCA GCTCCTTGT CCTGGCCGCG					
490	500	510	520	530	540
CGCCACCTGC CCGACACCAT GTTCGACAAC TATGACCTGT GCGGTGCGGC CAACGATCGC					
550	560	570	580	590	600
GCCAGCAAGC TCTTCCGCGC GGATCGCGAC GTGGGTGCC GCATGTCGTT CCACACGGCC					
610	620	630	640	650	660
GACGTCGCGG ACCTCGCCGG CGAGCTCGCC AAGTACGACG TTGTCTTCCT GGCGCACTC					
670	680	690	700	710	720
GTCGGCATGG CCGCCGAGGA CAAGGCGAAG GTGATCGCGC ACCTCGCGC ACACATGGCA					
730	740	750	760	770	780
GACGGGGCGG CCCTCGTCGT GCGCAGCGCA CACGGAGCGC GCGGGTTCCT GTACCCGATC					
790	800	810	820	830	840
GTCGACCCCC AGGACATCGG CCGAGCCGGG TTGAGGTGC TGGCCGTGTG CCATCCCGAC					
850	860	870	880	890	900

特平10-137685

GACGACGTGG TGAACCTCCGT CATCATCGCA CAGAAGTCCA AGGACGTGCA TGCCGATGGA

910 920 930 940 950 960
CTTGGCAGCG GGC GTGGTGC CGGTGGACAG TACGCGCGGG GCACGGTGCC TGTTGTCAGC

970 980 990 1000 1010 1020
CCCCCGTGCA GGTCGGCGA GATGGTGGCG GACGTGACCC AGAACCAACAA GAGAGACGAG

1030	1040	1050	1060	1070	1080
TTTGCCAACG	CCGAAGTGGC	CTTTGATCG	TTCGCTGCCA	GGGTGTGCAT	CCATGATCCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TCCATACCTC GTTCTGTGAT TGCATCAAGC TTGCAATCGT ATGCATTCA AGTCACGTGT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TGCTTCTATC CAATAATGTA CGTGTGGTGT TTACACGCCGA ATGTCTTGTAA GACCTTTGTA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TGTGTACAAG TGAATTTAA TTCACAAAGTA CATATAATGG TCACCATTGA AAAGATGTTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGTGTGTGTT TTCCAATATA TGTTTGTGTA AGGTTCATCA TCTAATAAAA TATGTTGGAA

1330 1340 1350 1360 1370 1380

ACCCAAAAAA AAAAAAAA AA..... .

配列番号：5

配列の長さ： 3 3 5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Ala Ala Gln Asn Asn Asn Lys Asp Val Ala Ala Leu Val Glu	15
Lys Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu	30
Ser Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr	45
Ala Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro	60
Glu Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu	75
Ala Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala	90
Phe Asp Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser	105
Asn Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg	120
Tyr Val Arg Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser	135
Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu	150
Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn	165
Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Thr Asp Val Gly Ala	180
Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Ser Glu	195
Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met	210
Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His	225
Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala	240
Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg	255
Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val	270
Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Glu Val His Ala	285
Asp Gly Leu Gly Ser Ala Arg Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Ala Arg	300
Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met	315
Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn	330
Ala Glu Val Ala Phe	335

配列番号：6

配列の長さ：1314

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10 20 30 40 50 60

CTACTTCACT CACACTAGTG CCCAGAAAGA AGGCTGCAAT GGCTGCCAG AACAAACAACA

70 80 90 100 110 120

AGGATGTCGC TGCCCTGGTG GAGAAGATCA CCGGGCTCCA CGCCGCCATC GCCAAGCTGC

130 140 150 160 170 180

CGTCGCTCAG CCCATCCCCG GACGTCGACG CGCTCTTCAC CGAGCTGGTC ACGGCGTGC

190 200 210 220 230 240

TTCCCCCGAG CCCCCGTGGAC GTGACCAAGC TCGGCCCGA GGCGCAGGAG ATGCGGGAGG

250 260 270 280 290 300

GCCTCATCCG CCTCTGCTCC GAGGCCGAGG GGAAGCTGGA GGCGCACTAC TCCGACATGC

310 320 330 340 350 360

TCGCCGCCTT CGACAACCCG CTGGATCACCC TCGGCATCTT CCCCTACTAC AGCAACTACA

370 380 390 400 410 420

TCAACCTCAG CAAGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCACGCTA CGTCCGGCGG CATCGCCCGG

430	440	450	460	470	480
CCCGCGTCGC GTTCATCGC TCCGGCCCGC TGCCGTTCA GCTCCTTGTC CTGGCCGCC					
490	500	510	520	530	540
GCCACCTGCC CGACACCATG TTTGACA ACT ACGACCTTG CGGCGCGGCC AACGATCGCG					
550	560	570	580	590	600
CCAGCAAGCT CTTCCGCGCG GACACGGACG TGGGTGCCCG CATGTCGTT CACACGGCCG					
610	620	630	640	650	660
ACGTCGCGGA CCTCGCCAGC GAGCTGCCA AGTACGACGT CGTCTCCTG GCCGCGCTCG					
670	680	690	700	710	720
TCGGCATGGC CGCCGAGGAC AAGGCCAAGG TGATCGCGCA CCTCGGCGCA CACATGGCAG					
730	740	750	760	770	780
ACGGGGCGGC CCTCGTCGTG CGCAGCGCAC ACGGAGCGCG CGGGTTCCCTG TACCCGATTG					
790	800	810	820	830	840
TCGACCCCCA GGACATCGGC CGCGGCGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGTGC CACCCCGACG					
850	860	870	880	890	900
ACGACGTGGT GAACTCCGTC ATCATCGCAC AGAAGTCCAA GGAGGTGCAT GCCGATGGAC					
910	920	930	940	950	960
TTGGCAGCGC GCGTGGTGCC GGTGACAGT ACGCGCGCGG CACGGTGCCG GTTGTCAAGCC					
970	980	990	1000	1010	1020

CCCCGTGCAG GTTCGGTGAG ATGGTGGCGG ATGTGACCCA GAACCACAAG AGAGACGAGT

1030 1040 1050 1060 1070 1080

TTGCCAACGC CGAAGTGGCC TTTGATCGA TCGTCGCCAA GGGACAATAA ATGAACGTGG

1090 1100 1110 1120 1130 1140

ATGTGGTAGG GTAATTGCC TACCTCGCTG CTTGATCGCT TGCAATATGT GCACATTTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200

CTACTACCGC TGCTTATGCA TTTCAAGCCA TGTGATGTTG GTATCCAATA AAGTATGTGT

1210 1220 1230 1240 1250 1260

AGGGTTTACA CGCAAATGTC TTTACACCTT GTACGTGTA GTGTTGACAA CGATGAATT

1270 1280 1290 1300 1310 1320

CAGTTCACAA TTAATAAATA GTATAATGGA TTCAAAAAAA AAAAAAAA AAAA.....

配列番号：7

配列の長さ：329

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Asp Gly Gln Ser Glu Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile 15

Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro 30

Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys 45

Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala	60
Gln Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu	195
Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg His Gly Ala Arg Gly Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly Phe	255
Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn Ser	270
Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Asn Asp Val His Glu Tyr Gly Leu	285
Gly Ser Gly Arg Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Val Pro	300
Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val	315
Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Asn Ala Glu Val Ala Phe	329

配列番号：8

配列の長さ：1249

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

特平10-137685

10 20 30 40 50 60
CCACTACCGA CTACCGTAGT ACCGTGCCTC AGAGCTCATC ACTGGTCAGG TACCAAGAAG

70 80 90 100 110 120
ACATAAAAAT GGACGGCCAG AGCGAGGAGG TCGACGCCCT TGTCCAGAAG ATCACCGGCC

130 140 150 160 170 180
TCCACGCCGC CATGCCAAG CTGCCCTCGC TCAGCCCCGTC CCCGGACGTC GACGCGCTCT

190 200 210 220 230 240
TCACCGACCT GGTACCCGCG TGCGTGCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTGCC

250 260 270 280 290 300
CGGAGGCGCA GGCGATGCGG GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGCAAGC

310 320 330 340 350 360
TGGAGGCGCA CTACTCCGAC ATGCTGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGCG

370 380 390 400 410 420
TCTTCCCCTA CTACAGCAAC TACATCAACC TCAGCAAGCT TGAGTACGAG CTCCTCGCG

430 440 450 460 470 480
GCTACGTGCC CGGCAGGCAT CGCCCGGCC GCGTCGCCCT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC

490 500 510 520 530 540
CGTTCAGCTC CTACGTCCCTC GCCGCGCGCC ACCTGCCCGA CACCGTGTTC GACAAC

550 560 570 580 590 600
ACCTGTGCCG CGCGGCCAAC GACCGCCGGA CCAGGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTG

610	620	630	640	650	660
GCGCCCGCAT GTCGTTCCAC ACCGCCGACG TCGCGGACCT CACCGACGAG CTCGCTACGT					
670	680	690	700	710	720
ACGACGTCGT CTTCCTGGCC GCGCTCGTGG GCATGGCCGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA					
730	740	750	760	770	780
TCGCGCACCT TGGCGCGCAC ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTTGCGCGG CACGGCGCGC					
790	800	810	820	830	840
GTGGGTTCCCT CTACCCGATC GTCGATCCCC AGGACATCGG TCGAGGGCGGG TTTCGAGGTGC					
850	860	870	880	890	900
TCGCCGTGTG TCACCCCGAC GACGACGTGG TGAACCTCCGT CATCATCGCA CAAAAGAGCA					
910	920	930	940	950	960
ACGACGTGCA CGAGTATGGA CTTGGCAGCG GGCCTGGTGG ACGGTACGCG CGAGGCACGG					
970	980	990	1000	1010	1020
TGGTGCCGGT GGTCAGCCA CCCTGCAGGT TCGGCGAGAT GGTGGCAGAC GTGACCCAGA					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AGAGAGAGGA GTTGCCAAC GCGGAAGTGG CCTTCTGATT GCTGCTGAAT CGCTTGTGAT					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGTACGTGGT AATTTTCTA CTACTCCTCC TCCTACCACC ACCTATCACC TATGTATGCA					
1150	1160	1170	1180	1190	1200

TTTCAAGTCG TGTGTTGTT GTATCCAATA ATGTAAGTGA GATGTTACA CGCGCAAAAA

1210	1220	1230	1240	1250	1260
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA

配列番号：9

配列の長さ：267

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	15
Thr	Gly	Leu	His	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Pro	30
Ser	Pro	Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Phe	Thr	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Cys	45
Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Val	Asp	Val	Thr	Lys	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	60
Gln	Glu	Met	Arg	Gln	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Cys	Ser	Ala	Ala	Glu	75
Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	His	Tyr	Ser	Asp	Met	Leu	Thr	Ala	Leu	Asp	90
Ser	Pro	Leu	Asp	His	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Asn	Tyr	105
Val	Asn	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	His	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	His	Trp	120
Phe	Ser	Ser	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Tyr	His	Leu	Pro	Asp	Thr	Arg	135
Phe	Asp	Asn	Tyr	Asp	Arg	Cys	Ser	Val	Ala	Asn	Gly	Arg	Ala	Met	150
Lys	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Glu	Gly	Val	Arg	Ser	Arg	Met	Ala	165
Phe	His	Thr	Ala	Glu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Ala	Glu	Leu	Gly	Ala	180
Tyr	Asp	Val	Val	Phe	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Lys	195
Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Ile	Ala	His	Leu	Gly	Lys	His	Met	Ala	Asp	210
Gly	Ala	Val	Leu	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	His	Gly	Ala	Arg	Ala	Phe	225

Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Gly Phe	240
Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn	255
Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala	267

配列番号：10

配列の長さ：1122

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
ATCAATTGCA ATTCCATTGA TTTTCCCCTC ATATTTATC AAGCATCAGC TCCATCATAAC					
70	80	90	100	110	120
CACTACAGTC TACATTTTT TCCTTCTAGA AAAGCACTAC AACACCAGCC ATACCTACTT					
130	140	150	160	170	180
GGCAATCAAG TGACATGGAG GCCGAAAACG GCGAGGTGGC TGCTCTGGTC GAGAAGATCA					
190	200	210	220	230	240
CCGGTCTCCA CGCCGCCATC TCCAAGCTCC CGGCACTAACG CCCGTCTCCT CAAGTCGACG					
250	260	270	280	290	300
CGCTCTTCAC CGAGCTGGTT GCGGCGTGCG TCCCATCAAG CCCGGTGGAC GTGACCAAGC					
310	320	330	340	350	360
TCGGCCCCGA GGCGCAGGAG ATGCCGCAGG ACCTCATCCG TCTCTGCTCG GCCGCCGAGG					

特平10—137685

370 380 390 400 410 420
GGCTGCTCGA GGCGCACTAC TCCGACATGC TCACCGCGTT GGACAGCCCCG CTCGACCACC

430 440 450 460 470 480
TCGGCCGCTT CCCTTACTTC GACAACCTACG TCAACCTCAG CAAGCTCGAG CACGATCTTC

490 500 510 520 530 540
TGGCAGGCCA CTGGTTCAGC TCGCTTTCC TTGCGACGTA CCACCTGCCG GACACCCGGT

550 560 570 580 590 600
TCGACAACTA CGACCGGTGC AGCGTGGCGA ATGGCCGGGC GATGAAGCTG GTCGGCGCGG

610 620 630 640 650 660
CGGACGAGGG CGTGGCATCA CGCATGGCGT TCCACACGGC CGAACGTCACG GACCTCACGG

670 680 690 700 710 720
CTGAGCTCGG CGCTTACGAC GTGGTCTTCC TGGCCGCGCT CGTGGGAATG ACGTCCAAGG

730 740 750 760 770 780
AGAAGGCCGA CGCCATAGCG CACTTGGGGA AGCACATGGC AGATGGGGCG GTGCTTCGTG

790 800 810 820 830 840
CGCGAAGCGC GCACGGGGCG CGAGCGTTCC TGTATCCTGT CGTGGAGCTG GACGATGTCG

850 860 870 880 890 900
GGCGTGGTGG GTTCCAAGTG CTGGCCGTGC ACCACCCTGC AGGCGATGAG GTGTTCAACT

910 920 930 940 950 960

CATTCTAGT TGCCCGGAAG GTGAAAATGA GTGCCTAAAT TAAGAAAAGG GTGAGCCTGT

970 980 990 1000 1010 1020

CTGCTTGTGC AAATGGTGTC TCACATTGAT AATAACCAGA TGATACCCCTG CACATTGATG

1030 1040 1050 1060 1070 1080

GGGGTACTTG CAGTATGTT CAATGAGGTC TGGTTGTATC AAATATGAGT ATTTGGCTTA

1090 1100 1110 1120 1130 1140

ATAATATCAG CGAACATATGTT TCGATTAAAA AAAAAAAAAA AA.....

配列番号：11

配列の長さ：282

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	15
Thr	Gly	Leu	His	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Pro	30
Ser	Pro	Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Phe	Thr	Glu	Leu	Val	Ala	Cys		45
Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Val	Asp	Val	Thr	Lys	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	60
Gln	Glu	Met	Arg	Gln	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Cys	Ser	Ala	Ala	Glu	75
Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	His	Tyr	Ser	Asp	Met	Leu	Thr	Ala	Leu	Asp	90
Ser	Pro	Leu	Asp	His	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Asn	Tyr	105
Val	Asn	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	His	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	His	Val	120
Ala	Ala	Pro	Ala	Arg	Val	Ala	Phe	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Leu	Pro	135

Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Thr Tyr His Leu Pro Asp Thr Arg	150
Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Ser Val Ala Asn Gly Arg Ala Met	165
Lys Leu Val Gly Ala Ala Asp Glu Gly Val Arg Ser Arg Met Ala	180
Phe His Thr Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Ala Glu Leu Gly Ala	195
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Thr Ser Lys	210
Glu Lys Ala Asp Ala Ile Ala His Leu Gly Lys His Met Ala Asp	225
Gly Ala Val Leu Val Arg Glu Ala Leu His Gly Ala Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Phe	255
Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn	270
Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala	282

配列番号：12

配列の長さ：1044

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
GTGACATGGA GGCGAAAC GCGAGGTGG CTGCTCTGGT CGAGAAGATC ACCGGTCTCC					

70	80	90	100	110	120
ACGCCGCCAT CTCCAAGCTC CCGGCACTAA GCCCGTCTCC TCAAGTCGAC GCGCTCTCA					

130	140	150	160	170	180
CCGAGCTGGT TGCAGCGTGC GTCCCATCAA GCCCGGTGGA CGTGACCAAG CTCGGCCCGG					

190	200	210	220	230	240
-----	-----	-----	-----	-----	-----

AGGCAGGAGA GATGCCAG GACCTCATCC GTCTCTGCTC GGCGCCGAG GGGCTGCTCG

250 260 270 280 290 300

AGGCCACTA CTCCGACATG CTCACCGCGT TGGACAGCCC GCTCGACCAC CTCGGCCGCT

310 320 330 340 350 360

TCCCTTACTT CGACAACCTAC GTCAACCTCA GCAAGCTCGA GCACGATCTT CTGGCAGGTC

370 380 390 400 410 420

ACGTGGCGGC CCCGGCCCGC GTGGCGTTCA TCGGGTCGGG GCCACTGCCG TTCAGCTCGC

430 440 450 460 470 480

TCTTCCTTGC GACGTACAC CTGCCGGACA CCCGGTTCGA CAACTACGAC CGGTGCAGCG

490 500 510 520 530 540

TGGCGAATGG CCGGGCGATG AAGCTGGTCG GCGCGGCGGA CGAGGGCGTG CGATCACGCA

550 560 570 580 590 600

TGGCGTTCCA CACGGCCGAA GTCACGGACC TCACGGCTGA GCTCGCGCT TACGACGTGG

610 620 630 640 650 660

TCTTCCTGGC CGCGCTCGTG GGAATGACGT CCAAGGAGAA GGCGACGCC ATAGCGCACT

670 680 690 700 710 720

TGGGGAAGCA CATGGCAGAT GGGGCGGTGC TCGTGCACGAG AGCGCTGCAC GGGGCGCGAG

730 740 750 760 770 780

CGTTCTGTGTA TCCTGTCGTG GAGCTGGACG ATGTCGGCG TGTTGGGTTTC CAAGTGCCTGG

790	800	810	820	830	840
CCGTGCACCA CCCTGCAGGC GATGAGGTGT TCAACTCATT CATA GTTGCC CGGAAGGTGA					
850	860	870	880	890	900
AAATGAGTGC TTAAATTAAG AAAAGGGTGA GCCTGTCTGC TTGTGCAAAT GGTGTCTCAC					
910	920	930	940	950	960
ATTGATAATA ACCAGATGAT ACCCTGCACA TTGATGGGG TACTGCAGTA TGTTCAATG					
970	980	990	1000	1010	1020
AGGTCTGGTT GTATCAAATA TGAGTATTG GCTTAATAAT ATCAGCGAAT ATGTTTCGAT					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TAAAAAAA AAAAAAAA AAAA.....					

配列番号：13

配列の長さ：328

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Ser Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75

Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Gly Ile Ala Arg Pro Ala Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Ala Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Ser Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Arg Glu Leu	195
Ala Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Pro His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala Gln Ala Arg Gly	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly	255
Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn	270
Ser Val Ile Ile Ala His Lys Ser Lys Asp Val His Ala Asn Glu	285
Arg Pro Asn Gly Arg Gly Gly Gln Tyr Arg Gly Ala Val Pro Val	300
Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val Thr	315
His Lys Arg Glu Glu Phe Thr Asn Ala Glu Val Ala Phe	328

配列番号：14

配列の長さ：1352

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10

20

30

40

50

60

CTCCACTTCG CTCCCTGTGCC TCAGGTAGCC ACAACATACA GTATTAAAAT GGATGCCAG

70	80	90	100	110	120
AACAAAGGAGG TTGATGCCCT GGTCCAGAAG ATCACCGGCC TCCACGCCGC CATGCCAAG					
130	140	150	160	170	180
CTGCCGTCCC TCAGCCCATC ACCCGACGTC GACGGCTCT TCACCGACCT GGTACCCGCG					
190	200	210	220	230	240
TGCCTCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTGGGT CGGAGGGCGCA GGAGATGCGG					
250	260	270	280	290	300
GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGGAAGC TGGAGGGCGCA CTACTCCGAC					
310	320	330	340	350	360
ATGCTGGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGGCA TGTTCCCTA CTACAGCAAC					
370	380	390	400	410	420
TACATCAACC TCAGCAAGCT GGAGTACCGAG CTCCTGGCGC GCTACGTGCC GGGCGGCATC					
430	440	450	460	470	480
GCCCGGCCCG CTGTCGCGTT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC CGTTCAAGCTC CTACGTCCCTC					
490	500	510	520	530	540
GCCGCTCGCC ACCTGCCCGA CGCCATGTTC GACAACTAGC ACCTGTGTAG CGCGGCCAAC					
550	560	570	580	590	600
GACCGTGCGA GCAAGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTGG GCGCCCGCAT GTCTTCCAC					
610	620	630	640	650	660

ACCGCCGACG TAGCGGACCT CACCCGCGAG CTGCCGCGT ACGACGTCGT CTTCCTGGCC

670 680 690 700 710 720

GCGCTCGTGG GCATGGCTGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA TTCCGCACCT CGGCGCGCAC

730 740 750 760 770 780

ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTCGTGCCG AGTGCAGCAGG CACGTGGTT CCTCTACCCG

790 800 810 820 830 840

ATCGTCGATC CCCAGGACAT CGGTCGAGGC GGGTTTGAGG TGCTGGCCGT GTGTCACCCC

850 860 870 880 890 900

GACGATGACG TGGTGAACTC CGTCATCATC GCACACAAAGT CCAAGGACGT GCATGCCAAT

910 920 930 940 950 960

GAACGTCCA ACGGCGTGG TGGACAGTAC CGGGGCGCGG TACCGGTGGT CAGCCCGCCG

970 980 990 1000 1010 1020

TGCAGGTTCG GTGAGATGGT GGCGGACGTG ACCCACAAGA GAGAGGAGTT CACCAACCGC

1030 1040 1050 1060 1070 1080

GAAGTGGCCT TCTGATCGTT GCGAGGAAAT GAAAATGAAG GTGGACGTGT GTGGTCAGCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140

TCCATACGTG GCTGCCTGCT TCATCGCTTG CAATCGTACT ACTACCTACC TATGCAGTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200

AAGTCATGTG TTGTCAATGT AAGTGTGATG TTTACACTAG TCTATGAAAG GCAGGGCAGA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CGAGGGTAGT GTGCCAAGTA ACAGTGTGTC ATTATAGGTG TAAGTGTGA GAATAAGACC

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 ATTTTGTTCA CAAATAGTA TGATGTAATC GGTGTCAATAT TCGTATTGAG TACATTTGTC

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 AAGTTGGTTG CTAAAAAAA AAAAAAAA AA.....

配列番号：15

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：アラビドプシス

配列

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Ile Asp Leu	15
Tyr Asp Gln Ile Ser Lys Leu Lys Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn	30
Val Asp Thr Leu Phe Gly Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr	45
Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Asn Met Cys Glu Glu Val Lys Asp	60
Met Arg Ala Asn Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly Tyr	75
Leu Glu Gln His Phe Ser Thr Ile Leu Gly Ser Leu Gln Glu Asp	90
Gln Asn Pro Leu Asp His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn	105
Tyr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His	120
Ser Ser His Val Pro Thr Lys Ile Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro	135
Met Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn	150

Thr Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu	165
Ala Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Pro Asp Leu Ser Lys Arg Met	180
Ile Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Thr Glu Ala Leu Asp	195
Gln Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys	210
Glu Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala	225
Pro Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Arg Ala His Ala Leu Arg Ala	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Ser Asp Leu Lys Gly Phe Gln	255
Leu Leu Thr Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Val Asn Ser Val	270
Val Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Pro Thr Thr Pro Gly Val Asn	285
Gly Thr Arg Gly Cys Met Phe Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Ile	300
His Ala Ile Met Asn Asn Arg Gly Lys Lys Asn Met Ile Glu Glu	315
Phe Ser Thr Ile Glu	320

配列番号：16

配列の長さ：963

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：アラビドプシス

配列

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATCG ACTTGTACGA CCAAATCTCA	60
AAGCTCAAGA GCTTAAAACC TTCCAAAAAT GTGACACTT TGTCGGACA ACTCGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CCACGGATAAC AAACATCGAT GTCACAAATA TGTGTGAAGA AGTCAAAGAC	180
ATGAGAGCTA ATCTCATCAA GCTTTGTGGT GAAGCCGAAG GTTATTGGA GCAACACTTC	240
TCCACAATTT TGGGATCTTT ACAAGAAGAC CAAAACCCAC TTGACCATTT ACACATCTT	300
CCTTACTACT CCAACTACCT CAAGCTAGGC AAGCTCGAGT TCGATCTCCT GAGCCAACAC	360
TCAAGCCATG TCCCCACCAA GATTGCCTTC GTGGGTTCGG GTCCGATGCC TCTCACATCC	420

ATCGTATTGG CCAAGTTCA CCTCCCCAAC ACGACGTTCC ACAACTTGATCGACTCA	480
CACGCAAACA CACTCGCTTC AAACCTCGTC TCTCGCGACC CGGACCTCTC AAAACGCATG	540
ATCTTCCACA CAACGGACGT ACTAAACGCA ACCGAAGCCC TTGACCCAATA TGACGTCGTT	600
TTCTTAGCGG CGCTTGTAGG GATGGACAAA GAGTCAAAGG TCAAAGCCAT CGAGCACTTG	660
GAGAAACACA TGGCTCCTGG AGCTGTTCTT ATGCTAAGGA GGGCTCATGC TCTCAGAGCT	720
TTCTTATATC CAATCGTTGA CTCGTCTGAT CTCAAAGGCT TTCAACTCTT GACCATCTAT	780
CATCCAACCG ATGACGTGGT TAACTCGGTT GTGATGCCAC GTAAGCTCGG TGGTCCGACC	840
ACGCCCGGGG TTAATGGTAC TCGTGGATGC ATGTTTATGC CTTGTAACTG CTCCAAGATT	900
CACGCGATCA TGAACAACCG TGGTAAGAAG AATATGATCG AGGAGTTAG TACCATCGAG	960
TAA	963

配列番号：17

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：アラビドプシス

配列

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Met Asp Leu	15
Tyr Asn Gln Ile Ser Asn Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn	30
Val Asp Thr Leu Phe Arg Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr	45
Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Glu Ile His Asp Glu Lys Val Lys	60
Asp Met Arg Ser His Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly	75
Tyr Leu Glu Gln His Phe Ser Ala Ile Leu Gly Ser Phe Glu Asp	90
Asn Pro Leu Asn His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr	105
Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His Thr	120
Thr His Val Pro Thr Lys Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Met	135

Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn Thr	150
Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu Ala	165
Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Ser Asp Leu Ser Lys Arg Met Ile	180
Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Lys Glu Gly Leu Asp Gln	195
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys Glu	210
Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Val Met Leu Arg Ser Ala His Gly Leu Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Cys Asp Leu Lys Gly Phe Glu Val	255
Leu Thr Ile Tyr His Pro Ser Asp Asp Val Val Asn Ser Val Val	270
Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Ser Asn Gly Ala Arg Gly Ser Gln	285
Ile Gly Arg Cys Val Val Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Val His	300
Ala Ile Leu Asn Asn Arg Gly Met Glu Lys Asn Leu Ile Glu Glu	315
Phe Ser Ala Ile Glu	320

配列番号：18

配列の長さ：963

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：アラビドプシス

配列

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATGG ACTTATAACAA CCAAATCTCA	60
AACCTCGAGA GCTTAAAACC ATCCAAGAACAT GTCGACACTT TGTTCAGACA ACTTGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CAACGGACAC GAACATCGAT GTCACAGAGA TACACGATGA AAAAGTCAAA	180
GACATGAGAT CTCATCTCAT CAAGCTTGT GGTGAAGCCG AAGGTTATT AGAGCAACAC	240
TTTCAGCAA TCTTAGGCTC TTTTGAAGAC AACCCCTCTAA ACCATTACA CATCTTCCCC	300
TATTACAACA ACTATCTCAA ACTAGGCAAA CTCGAATTGG ATCTCCTTTC TCAGCACACA	360
ACCCATGTCC CGACCAAAGT CGCCTTATT GGTTCCGGTC CGATGCCACT TACTTCCATC	420

GTCTTGGCCA AGTTCCACCT CCCAACACA ACGTCCACA ACTTCGACAT CGACTCACAC	480
GCCAACACAC TCGCTTCAAA CCTCGTTCT CGTGATTCTG ACCTTCCAA ACGCATGATT	540
TTCCACACAA CTGATGTATT AAACGCTAAG GAGGGGTTAG ACCAATACGA TGTTGTTTC	600
TTGGCAGCTC TTGTTGGAT GGATAAAGAG TCAAAGGTCA AAGCTATTGA GCATTTAGAG	660
AAGCATATGG CCCCTGGAGC TGTGGTGTATG CTAAGAAGTG CTCATGGTCT TAGAGCTTTC	720
TTGTATCCAA TCGTTGACTC TTGTGATCTT AAAGGGTTTG AGGTGTTAAC CATTATCAT	780
CCGTCTGACG ACGTGGTTAA TTCGGTGGTC ATCCACGTA AGCTTGGTGG TTCAAATGGA	840
GCTCGAGGCA GCCAGATCGG ACGGTGTGTG GTTATGCCTT GTAATTGCTC TAAGGTCCAC	900
GCGATCTTGA ACAATCGTGG TATGGAGAAG AATTGATCG AGGAGTTAG TGCCATCGAG	960
TAA	963

配列番号：19

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：アラビドブシス

配列

Met Gly Cys Gln Asp Glu Gln Leu Val Gln Thr Ile Cys Asp Leu	15
Tyr Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Glu Asp	30
Val Asn Ile Leu Phe Lys Gln Leu Val Ser Thr Cys Ile Pro Pro	45
Asn Pro Asn Ile Asp Val Thr Lys Met Cys Asp Arg Val Gln Glu	60
Ile Arg Leu Asn Leu Ile Lys Ile Cys Gly Leu Ala Glu Gly His	75
Leu Glu Asn His Phe Ser Ser Ile Leu Thr Ser Tyr Gln Asp Asn	90
Pro Leu His His Leu Asn Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr Leu	105
Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Glu Gln Asn Leu Asn	120
Gly Phe Val Pro Lys Ser Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu	135

Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Ser Phe His Leu Lys Asp Thr	150
Ile Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Pro Ser Ala Asn Ser Leu Ala	165
Ser Leu Leu Val Ser Ser Asp Pro Asp Ile Ser Gln Arg Met Phe	180
Phe His Thr Val Asp Ile Met Asp Val Thr Glu Ser Leu Lys Ser	195
Phe Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asn Lys Glu	210
Glu Lys Val Lys Val Ile Glu His Leu Gln Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Ser Ala His Gly Pro Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Glu Pro Cys Asp Leu Gln Gly Phe Glu Val	255
Leu Ser Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Ile Asn Ser Val Val	270
Ile Ser Lys Lys His Pro Val Val Ser Ile Gly Asn Val Gly Gly	285
Pro Asn Ser Cys Leu Leu Lys Pro Cys Asn Cys Ser Lys Thr His	300
Ala Lys Met Asn Lys Asn Met Met Ile Glu Glu Phe Gly Ala Arg	315
Glu Glu Gln Leu Ser	320

配列番号：20

配列の長さ：963

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：アラビドプシス

配列

ATGGGTTGCC AAGACGAACA ATTGGTGCAA ACAATATGCG ATCTCTACGA AAAGATCTCA	60
AAGCTTGAGA GTCTAAAACC ATCCGAAGAT GTCAACATTG TCTTCAAGCA GCTCGTTCC	120
ACATGCATAC CACCAAACCC TAACATCGAT GTCACCAAGA TGTGTGACAG AGTCCAAGAG	180
ATTGCACTTA ATCTCATCAA GATTTGTGGT CTAGCCGAAG GTCACTTAGA AAACCATTTC	240
TCTTCGATCT TGACCTCTTA CCAAGACAAC CCACITCAGC ATTTAAACAT TTTCCCTTAT	300
TACAACAACT ATTTGAAACT CGGAAAGCTC GAGTTCGACC TCCTCGAACAA AACCTAAAT	360

GGCTTGTC	CAAAGAGTGT	GGCTTCATT	GGATCTGGTC	CTCTCCTCT	CACTCCATC	420
GTTCTGCTT	CATTCCATCT	CAAAGACACA	ATCTTCACA	ACTTGACAT	CGACCCATCA	480
GCGAACTCAC	TCGCTTCTCT	TCTGGTTCC	TCTGATCCAG	ACATCTCTCA	ACGCATGTT	540
TTCCACACCG	TTGATATAAT	GGACGTGACA	GAGAGCTTAA	AGAGCTTGA	TGTCGTGTT	600
CTAGCTGCTC	TTGTTGGAAT	GAACAAAGAG	GAGAAAGTTA	AAGTGATCGA	GCATCTGCAG	660
AAACACATGG	CTCCTGGTGC	TGTGCTCATG	CTTAGGAGTG	CTCATGGTCC	GAGAGCGTT	720
CTTTATCCGA	TCGTTGAGCC	GTGTGATCTT	CAGGGGTTCG	AGGTTTGTC	TATTTATCAC	780
CCAACAGATG	ATGTTATCAA	CTCCGTGGTG	ATCTCTAAAA	AGCATCCAGT	TGTTTCAATT	840
GGGAATGTTG	GTGGTCCTAA	TTCATGCTTG	CTCAAGCCTT	GCAACTGTTC	CAAGACCCAC	900
GCGAAAATGA	ACAAGAACAT	GATGATCGAG	GAGTCGGAG	CTAGGGAGGA	ACAGTTGTCT	960
TAA						963

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ムギネ酸類の生合成経路を示すものである。

【図2】

図2は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程での両者の比較を示すものである。

【図3】

図3は、30～35kDa付近の分取SDS-PAGEを示す。横棒は各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したもの。

【図4】

図4は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターン。黒丸は酵素活性を示す。

【図5】

図5は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した6つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「：」で示した。

【図6】

図6は、NAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図5の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

【図7】

図7は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印はNAS5-1及び5-2以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図5の部分配列と一致した部分を示している。

【図8】

図8は、マルトースバインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー

(TLC) で検出した結果を示すものである

【図9】

図9は、NAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図10】

図10は、nas1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図11】

図11は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンプロット解析を示す。

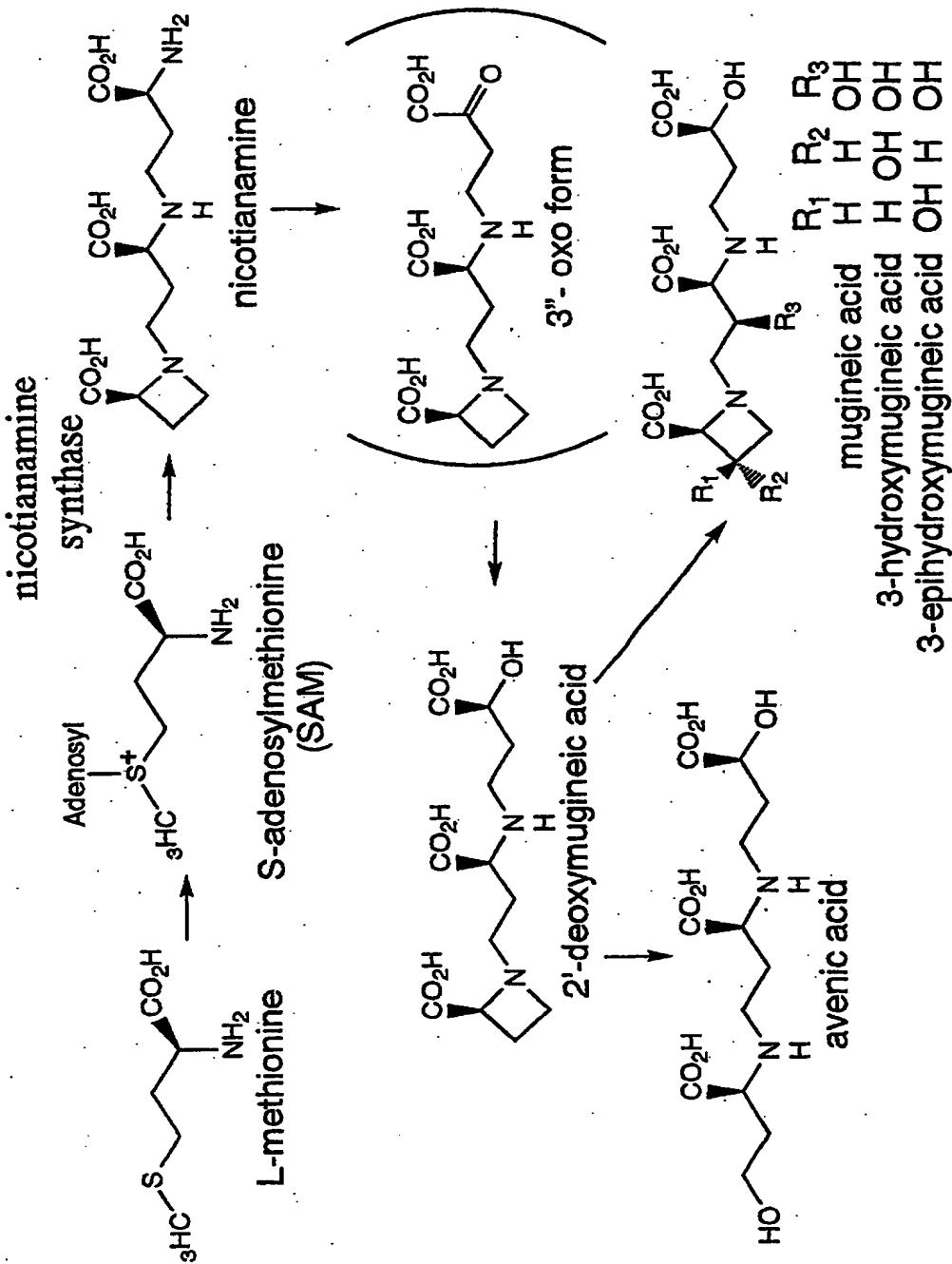
【図12】

図12は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンプロット解析を示す。

【書類名】

図面

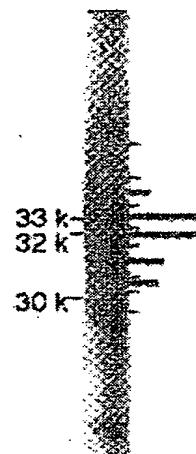
【図 1】



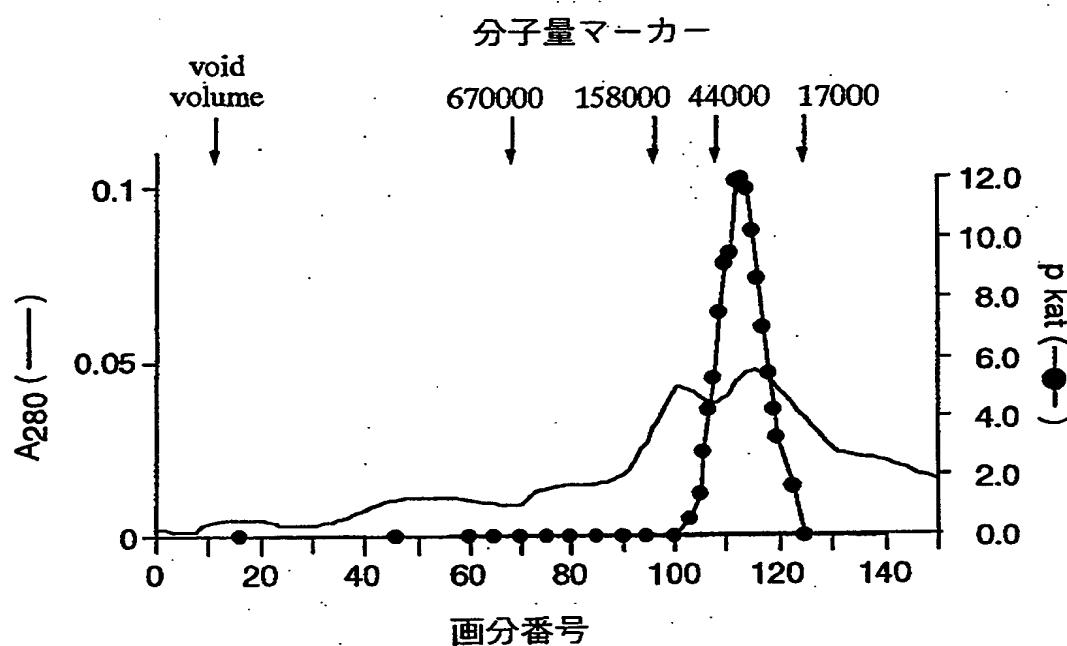
特平10-137685

【図3】

図面代用写真



【図4】



【図5】

図面に代える写真

DAQKEVAALIEKIAIGIQA
[33,32 kDa -1] [33,32 kDa -2] REALIRL
::: :::::
MEAQNQEY~~VAL~~VEKIAGLHAISKLPSLSPSAEVDALFTDLVTACVPASPYDVAKLGPEAQAMREELIRLC
NF primer NR primer

rice (D24790) YVNLSKLEYDLLVRYVPGIAPTRVAFVGSGPLPFSSLVLAAHHLPAFDNYDRCGANERARRLFRGADEGLGARM~
IF primer ~AFHTGDVATLTGEGAYDVFLATLYGMAAEEKP
SFHTADVADLTGEGAYDVFLAALVDMAAEEAKVIAHLGAHMVEGASLWVYSAHGARGFLYP
AFHTAEVTDLTAEGLAYDV
[33,32 kDa -3] [30 kDa -2] ADGAVLVARSAGARAFLYPVVELDDVGR
[30 kDa -1]

rice (D23792) [33,32 kDa -4] PEDIRGGFEVLAVHHPEGE

【図6】

画面に代える写真

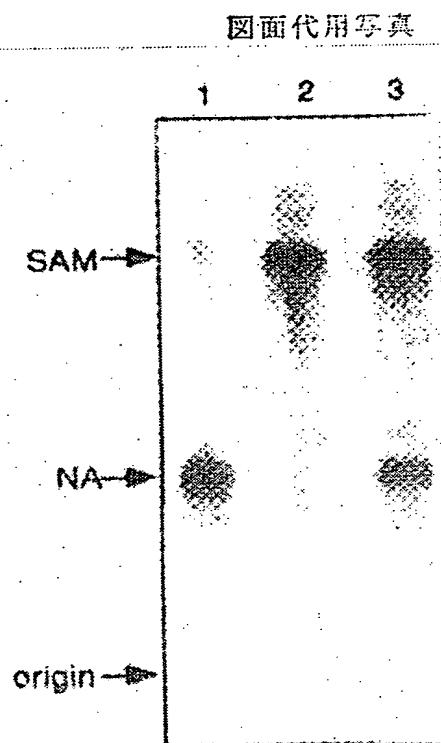
	GCG TTC AGA GGC TTC CAG AGT TCT TCC GGT CAC CAA GAA GCA TTT GAT CAT AAC	54
19	ATG GAT GCC CAG AAC AAG GAG GTC GCT GCT CTG ATC GAG AAG ATC GCC GGT ATC M D A Q N K E V A A L I E K I A G I	108
37	CAG GCC GCC ATC GCC GAG CTG CCG TCG CTG AGC CCG TCC CCC GAG GTC GAC AGG Q A A I A E L P S L S P S P E V D R	162
55	CTC TTC ACC GAC CTC GTC ACG GCC TGC GTC CCG AGC CCC GTC GAC GTG ACG L F T D L V T A C V P P S P V D V T	216
73	AAG CTC AGC CCG GAG CAC CAG AGG ATG CGG GAG GCT CTC ATC CSC TTG TGC TCC K L S P E H Q R M R E A L I R L C S	270
91	GCC GCC GAG GGG AAG CTC GAG GCG CAC TAC GCC GAC CTG CTC GCC ACC TTC GAC A A E G K L E A H Y A D L L A T F D	324
109	AAC CCG CTC GAC CAC CTC GGC CTC TTC CCG TAC TAC AGC AAC TAC GTC AAC CTC N P L D H L G L F P Y Y S N Y V N L	378
127	AGC AGG CTG GAG TAC GAG CTC CTG GCG CGC CAC GTG CCG GGC ATC GCG CCG GCG S R L E Y E L L A R H V P G I A P A	432
145	CGC GTC GCC TTC GTC GGC TCC GGC CCG CTG CCG TTC AGC TCG CTC GTC CTC GCC R V A F V G S G P L P F S S L V L A	486
163	GCG CAC CAC CTG CCC GAG ACC CAG TTC GAC AAC TAC GAC CTG TGC GGC GCG GCC A H H L P E T Q F D N Y D L C G A A	540
181	AAC GAG CGC GCC AGG AAG CTG TTC GGC GCG AGC GCG GAC GGC GTC GGC CGT H E R A R K L F G A T A D G V G A R	594
199	ATG TCG TTC CAC ACG GCG GAC GTC GCC GAC CTC ACC CAG GAG CTC GGC GCC TAC M S F H T A D V A D L T Q E L G A Y	648
217	GAC GTG GTC TTC CTC GCC GCG CTC GTC GGC ATT GTC GAC CCG GAG GAC AAG GCC AAG D V V F L A A L V G M A A E E K A K	702
235	GTG ATT GCC CAC CTG GGC GCG CAC ATG GTG GAG GGG GCG TCC CTG GTC GTG CGG V I A H L G A H M V E G A S L V V R	756
253	AGC GCA CGG CCC CGC GGC TTT CTT TAC CCC ATT GTC GAC CCG GAG GAC ATC AGG S A R P R G F L Y P I V D P E D I R	810
271	CGG GGT GGG TTC GAG GTG CTG GCC GTG CAC CAC CCG GAA GGT GAG GTG ATC AAC R G G F E V L A V H H P E G E V I N	864
289	TCT GTC ATC GTC GCC CGT AAG GGC GTC GAA GCG CAG CTC AGT GGG CCG CAG AAC S V I V A R K A V E A Q L S G P Q N	918
307	GGA GAC GCG CAC GCA CGG GGC GCG GTG CGG TTG GTC AGC CCG CCA TGC AAC TTC G D A H A R G A V P L V S P P C N F	972
325	TCC ACC AAG ATG GAG GCG AGC GCG CTT GAG AAG AGC GAG GAG CTG ACC GCC AAA S T K M E A S A L E K S E E L T A K	1026
	GAG CTG GCC TTT TGA TTG AAG AGT GCG CGT GGT CAT TCT GTC GCC TGC GAT CGT E L A F *	1080
	GGT AAC TTT CCT ACT CGT GTG TGT TTT GAT GTT TGT GCC TGT AAG AGT TAT GCT TCC GGC CTT GTG CTG TTA ATT TAC ACG CGT TAC ATG TAG TAC TTG TAT TTA TAC	1134
	CTG GAA TAA CGG TAT GTA ACA TAA ATA TTA GTG GGA TTT GAA GTG TAA TGC TAA ATA ATA AGA AAA CTT GAT GCA GAC ATT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA	1188
		1242

【図7】

図面に代える写真

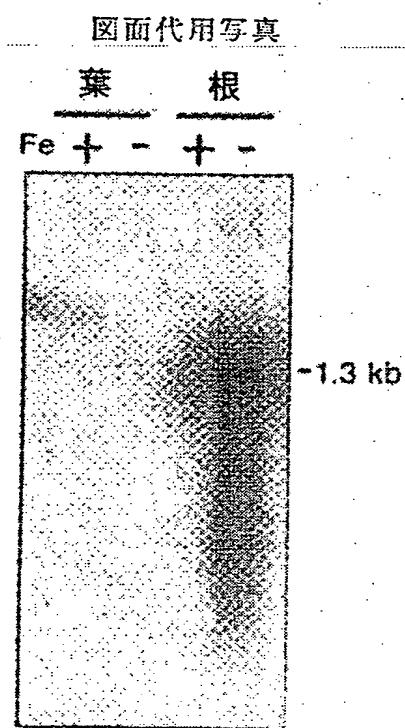
NAS 1	1 MDAQN--KEV AALIEKIAGI QAAIAELPSL SPSPEVDRLF TDLVTACVPP	50
NAS 2	1 MAAQNN-QEV DALVEKITGL HAAIAKLPNL SPSPDVDAFL TELVTACVPP	50
NAS 3	1 MAAQNNNKDV AALVEKITGL HAAIAKLPNL SPSPDVDAFL TELVTACVPP	50
NAS 4	1 MDGQSE--EV DALVQKITGL HAAIAKLPNL SPSPDVDAFL TDLVTACVPP	50
NAS 5-1	1 MEAENG--EV AALVEKITGL HAAISKLPAI SPSPQVDALF TELVAACVPS	50
NAS 5-2	1 MEAENG--EV AALVEKITGL HAAISKLPAI SPSPQVDALF TELVAACVPS	50
NAS 6	1 MDAQN--KEV DALVQKITGL HAAIAKLPNL SPSPDVDAFL TDLVTACVPP	50
	* * * * *	*****
NAS 1	51 SPVDVTKLSP EHQRMREALI RLCSEAEGKL EAHYADLLAT FDNPLDHLGL	100
NAS 2	51 SPVDVTKLGP EAQEMREGLI RLCSEAEGKL EAHYSDMLAA FDKPLDHLGM	100
NAS 3	51 SPVDVTKLGP EAQEMREGLI RLCSEAEGKL EAHYSDMLAA FDNPLDHLGI	100
NAS 4	51 SPVDVTKLAP EAQAMREGLI RLCSEAEGKL EAHYSDMLAA FDNPLDHLGV	100
NAS 5-1	51 SPVDVTKLGP EAQEMRQDLI RLCSEAEGLL EAHYSDMLTA LDSPLDHLGR	100
NAS 5-2	51 SPVDVTKLGP EAQEMRQDLI RLCSEAEGLL EAHYSDMLTA LDSPLDHLGR	100
NAS 6	51 SPVDVTKLGS EAQEMREGLI RLCSEAEGKL EAHYSDMLAA FDNPLDHLGM	100
	*****	*****
NAS 1	101 FPYYSNYVNLR SRLEYELLAR HVPG-IAPAR VAFVGSGPLP FSSLVLAHH	150
NAS 2	101 FPYYSNNYINL SKLEYELLAR YVPGYRPAR VAFIGSGPLP FSSFVLAARH	150
NAS 3	101 FPYYSNYINL SKLEYELLAR YVRR-HRPAR VAFIGSGPLP FSSFVLAARH	150
NAS 4	101 FPYYSNYINL SKLEYELLAR YVPGRHRPAR VAFIGSGPLP FSSYVLAARH	150
NAS 5-1	101 FPYFDNYVNLR SKLEHDLLAG HV----- FSSLFLATYH	150
NAS 5-2	101 FPYFDNYVNLR SKLEHDLLAG HV---AAPAR VAFIGSGPLP FSSLFLATYH	150
NAS 6	101 FPYYSNYINL SKLEYELLAR YVPGGIARPA VAFIGSGPLP FSSYVLAARH	150
	***	(****)***
NAS 1	151 LPETQFDNYD LCGAANERAR KLFGATADGV GARMSFHTAD VADLTQELGA	200
NAS 2	151 LPDTMFDNYD LCGAANDRAS KLFRADRD-V GARMSFHTAD VADLAGELAK	200
NAS 3	151 LPDTMFDNYD LCGAANDRAS KLFRADTD-V GARMSFHTAD VADLASLAK	200
NAS 4	151 LPDTVFDNYD LCGAANDRAT RLFRADKD-V GARMSFHTAD VADLTDELAT	200
NAS 5-1	151 LPDTVFDNYD RCSVANGRAM KLVGADEGV RSRMAFHTAE VTDLTAEGLA	200
NAS 5-2	151 LPDTVFDNYD RCSVANGRAM KLVGADEGV RSRMAFHTAE VTDLTAEGLA	200
NAS 6	151 LPDAMFDNYD LCSAANDRAS KLFRADKD-V GARMSFHTAD VADLTRELAA	200
	***	*****
NAS 1	201 YDVVFLAALV GMAAEKKAV IAHLGAHMVE GASLVVRSAR P-RGFLYPIV	250
NAS 2	201 YDVVFLAALV GMAEDKAKV IAHLGAHMAD GAALVVRSAH GARGFLYPIV	250
NAS 3	201 YDVVFLAALV GMAEDKAKV IAHLGAHMAD GAALVVRSAH GARGFLYPIV	250
NAS 4	201 YDVVFLAALV GMAEDKAKV IAHLGAHMAD GAALVAR--H GARGFLYPIV	250
NAS 5-1	201 YDVVFLAALV GMSKEKADA IAHLGKHMAD GAVLVARSAH GARAFLYPV	250
NAS 5-2	201 YDVVFLAALV GMSKEKADA IAHLGKHMAD GAVLVARSAH GARAFLYPV	250
NAS 6	201 YDVVFLAALV GMAEDKAKV IPHLGAHMAD GAALVVRSA- QARGFLYPIV	250
	*****	*
NAS 1	251 DPEDI RGGF EVLAVHPE- GEVINSVIVA RKAVEAQLSG PQNGD---A	300
NAS 2	251 DPQDI GRGGF EVLAVCHPD- DDVVNSVIIA QSKSDVHADG LGSGRGAGQQ	300
NAS 3	251 DPQDI GRGGF EVLAVCHPD- DDVVNSVIIA QKSKEVHADG LGSARGAGRQ	300
NAS 4	251 DPQDI GRGGF EVLAVCHPD- DDVVNSVIIA QSKSDVHADG LGSGRG-GR-	300
NAS 5-1	251 ELDDVGRGGF QVLAVHHPAG DEVFNSFIVA RKVKMSA	
NAS 5-2	251 DPQDI GRGGF EVLAVCHPD- DDVVNSVIIA HSKSDVHANE RPNGRG-G-Q	300
NAS 6	251 DPQDI GRGGF EVLAVCHPD- DDVVNSVIIA HSKSDVHANE RPNGRG-G-Q	300
	*	*****
NAS 1	301 HARGA-VPLV SPPCNSTKM EASALE--KS EELTAKELAF	
NAS 2	301 YARGT-VPVV SPPCRFGE-M VADVTQMHKR DEFANAEVAF	
NAS 3	301 YARGT-VPVV SPPCRFGE-M VADVTQMHKR DEFANAEVAF	
NAS 4	301 YARGTVPVV SPPCRFGE-M VADVTQ--KR EEFANAEVAF	
NAS 5-1		
NAS 5-2		
NAS 6	301 Y-RGA-VPVV SPPCRFGE-M VADVT--HKR EEFNTAEVAF (** **** * * * * * * *)	

【図8】



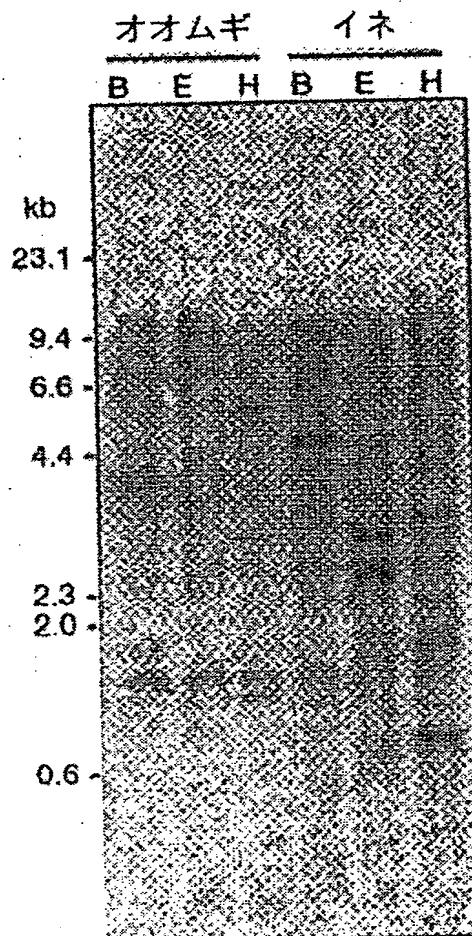
特平10-137685

【図9】



【図10】

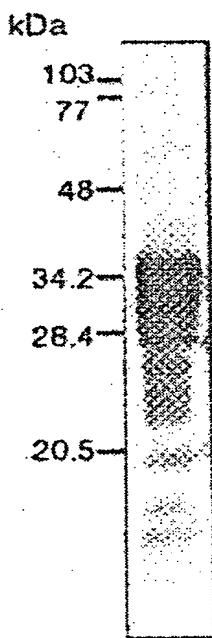
図面代用写真



特平10-137685

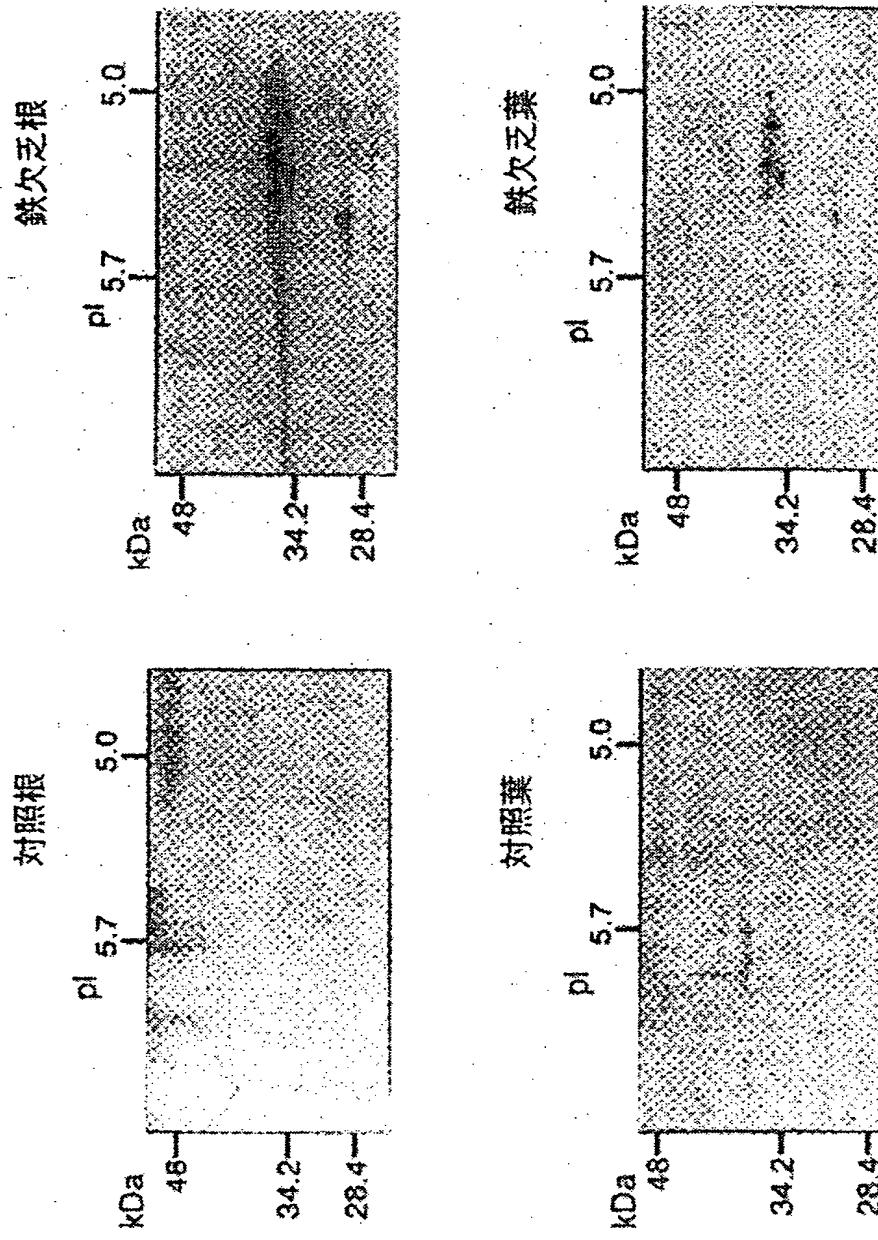
【図11】

図面代用写真



【図12】

図面代用写真

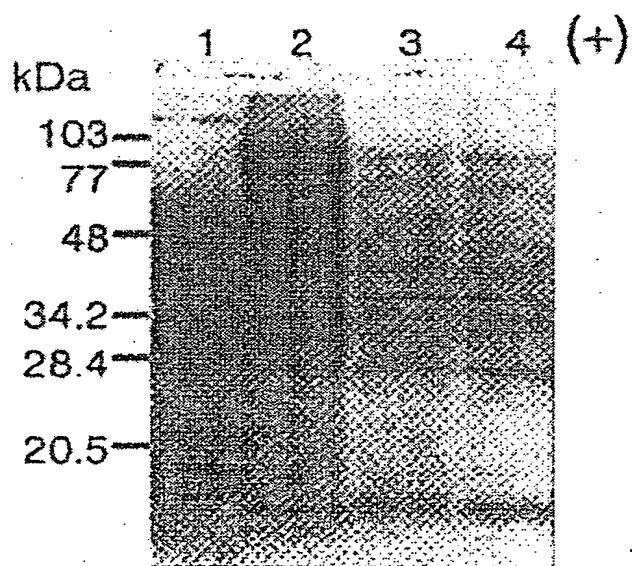
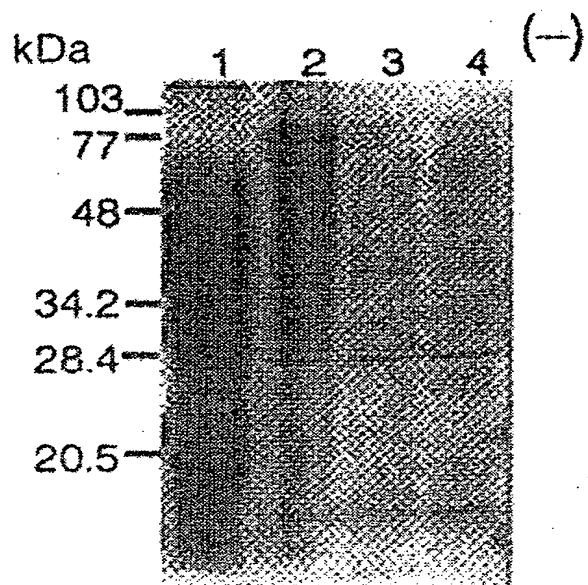


特平10-137685

【図2】

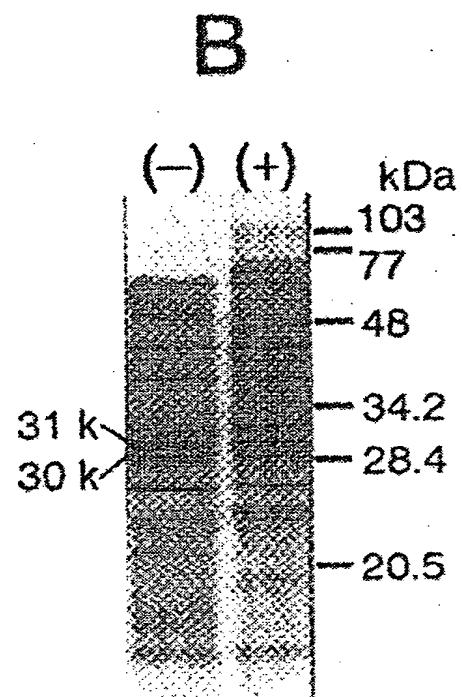
図面代用写真

A

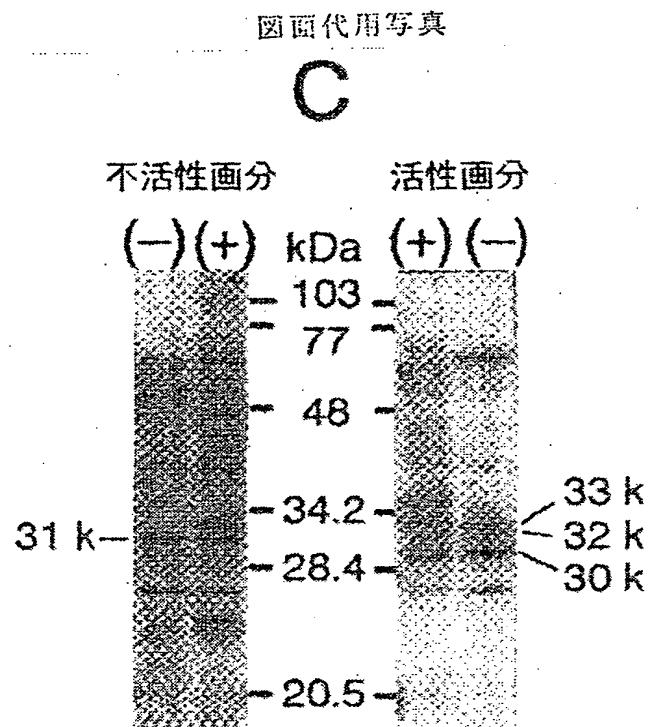


【図2】

図面代用写真



【図2】



【書類名】 要約書

1 / 1

【要約】

【課題】 本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

【解決手段】 本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、そのアミノ酸配列、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

【選択図】 なし

委任状

平成10年4月1日

私儀 識別番号100102668 弁理士 佐伯憲生氏

を代理人として次の事項を委任します。

発明の名称「ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子」

1. 特許出願に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更及び拒絶査定に対する審判の請求並びにその取下げ。
2. 上記出願に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ及び優先権主張に伴う後の出願に関する一切の件。
3. 上記出願の分割出願に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受ける事項。
5. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下げその他本件に関する提出書類及び物件の下附を受ける事項。
6. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続に関する事項。
7. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任する事項。

識別番号 396020800

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中村守孝



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100102668

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9

階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 PA906235

【提出日】 平成10年 7月21日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第137685号

【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【補正により増加する請求項の数】 0

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0013

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0014

【補正方法】 変更

【補正の内容】 2

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 図面の簡単な説明

【補正方法】 変更

【補正の内容】 3

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 全図

【補正方法】 変更

【補正の内容】 5

【0013】

対照の酵素活性は鉄欠乏の1/4であった。

本発明の酵素を精製する各段階の活性画分のペプチド組成を SDS-PAGE で比較したものを、図2、図13、及び、図14に示す。図2、図13、及び、図14は、鉄欠乏のオオムギの根200gからの精製過程（図中（-）で示す）と、対照のオオムギの根200gからの精製過程（図中（+）で示す）との比較を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲル（L a e m m l i, 1970）で行った。ゲルは、クマシーブリリアンドブルーで染色した。図2は、DEAEセファロースの前の段階のもので、上段は鉄欠乏のオオムギの根からのものを示し、下段は対照の根からのものを示す。各レーンの、レーン1は粗抽出物200μgのものを、レーン2はブチルトヨパール650M後のもの100μgのものを、レーン3はヒドロキシルアバタイト後のもの20μgのものを、レーン4はブチルトヨパール650M後のもの15μgのものを示している。図13は、DEAEセファロースFF後のもので、各レーン25μgのものである。図14は、エーテルトヨパール650M後のもので、左側は不活性分画を、右側は活性分画を示し、各画分の1/25を泳動させたものである。

【0014】

この結果から、D E A E セファロースの前の段階までは鉄欠乏、および対照とでほとんど違いは見られなかった（図2参照）。D E A E セファロース後、3 0 および3 1 k D a のペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかった（図1 3 参照）。エーテルトヨパール後、3 1 k D a ペプチドは活性画分から除かれた。新たに3 2 および3 3 k D a のペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかる（図1 4 参照）。3 2 および3 3 k D a ペプチドからは活性が検出されたが、3 0 k D a ペプチドからは検出されなかった（図3 参照）。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ムギネ酸類の生合成経路を示すものである。

【図2】

図2は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程での両者の比較を示すものである。

【図3】

図3は、30～35kDa付近の分取SDS-PAGEを示す。横棒は各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したもの。

【図4】

図4は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターン。黒丸は酵素活性を示す。

【図5】

図5は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した6つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。

【図6】

図6は、NAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図5の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

【図7】

図7は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印はNAS5-1及び5-2以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図5の部分配列と一致した部分を示している。

【図8】

図8は、マルトースバインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー

(TLC)で検出した結果を示すものである

【図9】

図9は、NAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図10】

図10は、n a s 1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図11】

図11は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンプロット解析を示す。

【図12】

図12は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンプロット解析を示す。

【図13】

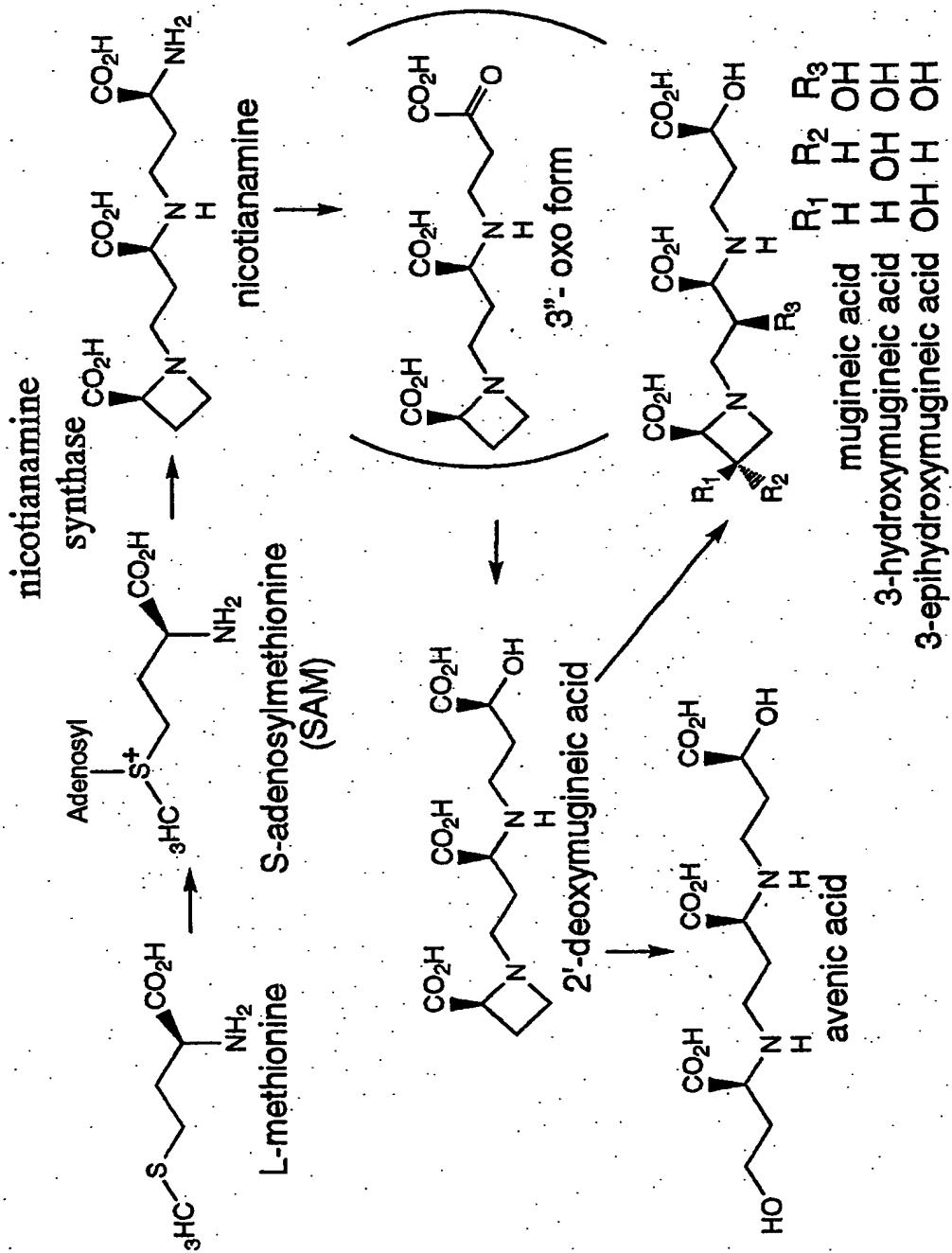
図13は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるD E A E セファロース F F 後での両者の比較を示すものである。

【図14】

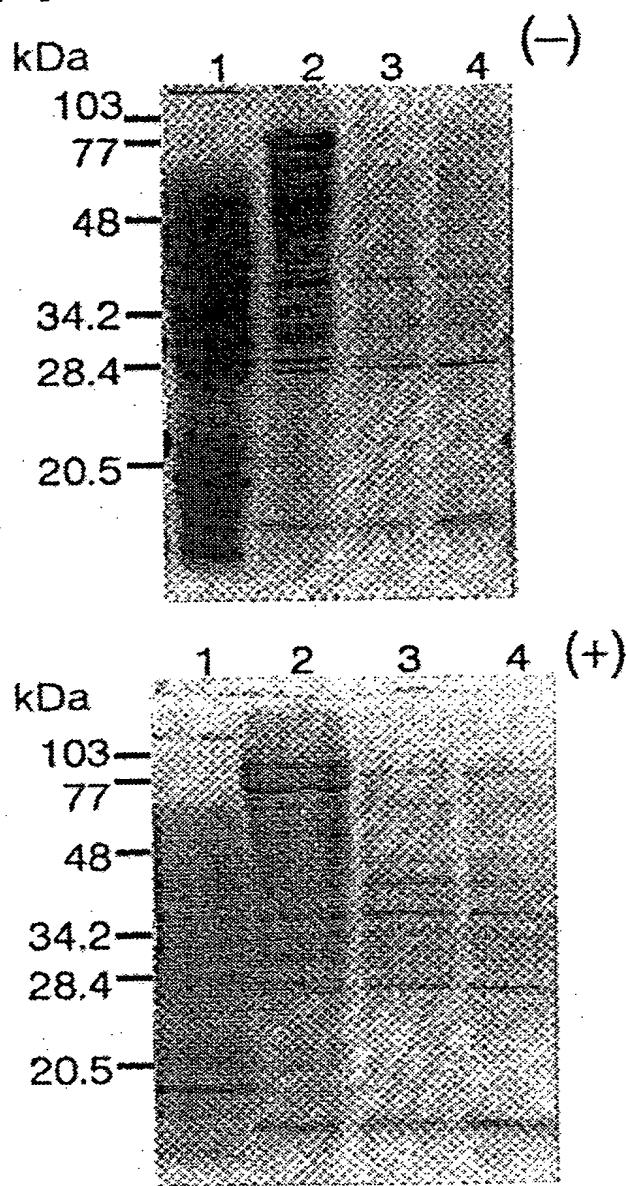
図14は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるエーテルトヨパール 6 5 0 M 後での両者の比較を示すものである。

【書類名】 図面

【図1】



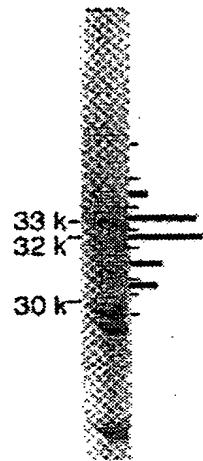
【図2】



図面代用写真

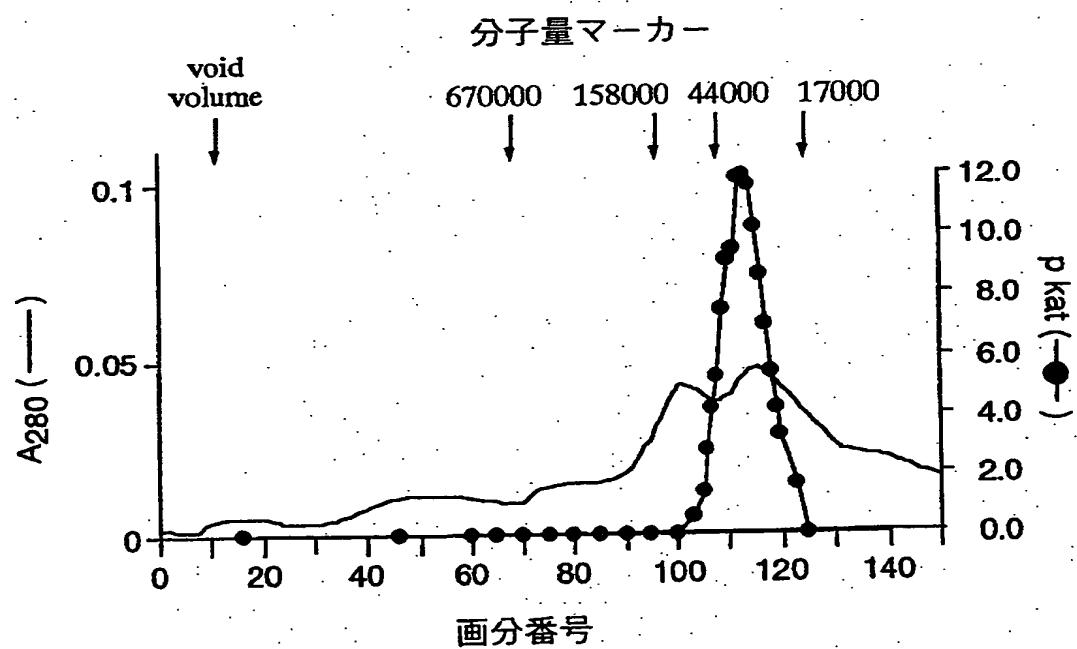
特平10-137685

【図3】



写真用代面圖

【図4】



【図5】

33,32 kDa -1 DAQNKEVAALIEKIAIGQ
 rice (D24790) MEAQNQEVAALVEKIAGLHAIAISKLPSLSPSAEVDAFLFTDLVTACVPASPVDAVAKLGPEAQAMREELIRLC
 NF primer

33,32 kDa -2 REALIRL
 rice (D23792) YVNLSKLEYQLLVRYVPGIAPTRVAFVGSGPLPFSSLVLAHHHLPAVFDNYDRCGAANERARRLFRGADEGLGARM~
 IF primer ~AFHTGDVATLTGELGAYDVFLATLGWMAEEKKP
 IR primer SFHTADYADLTQELGAYDVFLAALYDMAEAEKAKVTAHLGAHMVEASLVVYSAHARGAEFLYP
 33,32 kDa -3 AFHTAEVTDLTAEGLGAYDV
 30 kDa -1 ADGAVLVARSAAHGFARFLYPVWELDDVGR

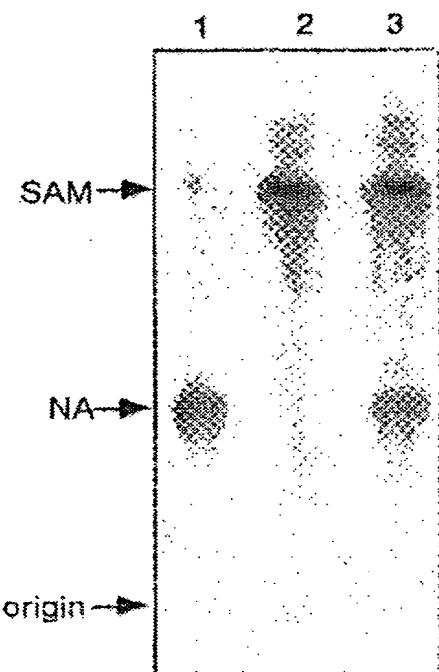
33,32 kDa -4 PEDIRGGFFEVLAHVHPEGE

【図6】

	GCG TTC AGA GGC TTC CAG AGT TCT TCC GGT CAC CAA GAA GCA TTT GAT CAT AAC	54
19	ATG GAT GCC CAG AAC AAG GAG GTC GCT GCT CTG ATC GAG AAG ATC GCC GGT ATC M D A Q N K E V A A L I E K I A G T	108
37	CAG GCC GCC ATC GCC GAG CTG CCG TCG CTG AGC CCG TCC CCC GAG GTC GAC AGG Q A A I A E L P S L S P S P E V D R	162
55	CTC TTC ACC GAC CTC GTC ACG GCC TGC GTC CCG CGG AGC CCC GTC GAC GTG ACG L F T D L V T A C V P P S P V D V T	216
73	AAG CTC AGC CCG GAG CAC CAG AGG ATG CGG GAG GCT CTC ATC CGC TTG TGC TCC K L S P E H Q R M R E A L I R L C S	270
91	GCC GCC GAG GGG AAG CTC GAG GCG CAC TAC GCC GAC CTG CTC GCC ACC TTC GAC A A E G K L E A H Y A D L L A T F D	324
109	AAC CCG CTC GAC CAC CTC GGC CTC TTC CCG TAC TAC AGC AAC TAC GTC AAC CTC N P L D H L G L F P Y Y S N Y V N L	378
127	AGC AGG CTG GAG TAC GAG CTC CTG GCG CAC GTG CCG GGC ATC GCG CCG GCG S R L E Y E L L A R H V P G I A P A	432
145	CGC GTC GCC TTC GTC GGC TCC GGC CCG CTG CGG TTC AGC TCG CTC GTC CTC GCC R V A F V G S G P L P F S S L V L A	486
163	GCG CAC CAC CTG CCC GAG ACC CAG TTC GAC AAC TAC GAC CTG TGC GGC GCG GCC A H H L P E T Q F D N Y D L C G A A	540
181	AAC GAG CGC GCC AGG AAG CTG TTC GGC GCG AGC GCG GAC GGC GTC GGC GCG CGT N E R A R K L F G A T A D D G V G A R	594
199	ATG TCG TTC CAC ACG GCG GAC GTC GCC GAC CTC ACC CAG GAG CTC GGC GCC TAC M S F H T A D V A D L T Q E L G A Y	648
217	GAC GTG GTC TTC CTC GCC GCG CTC GTC GGC ATG GCA GGC GAG GAG AAG GCC AAG D V V F L A A L V G M A A E E K A K	702
235	GTG ATT GCC CAC CTG GGC GCG CAC ATG GTG GAG GGG GCG TCC CTG GTC GTG CGG V I A H L G A H M V E G A S L V V R	756
253	AGC GCA CGG CCC CGC GGC TTT CTT TAC CCC ATT GTC GAC CCG GAG GAC ATC AGG S A R P R G F L Y P I V D P E D I R	810
271	CGG GGT GGG TTC GAG GTG CTG GCC GTG CAC CAC CCG GAA GGT GAG GTG ATC AAC R G G F E V L A V H H P E G E V I N	864
289	TCT GTC ATC GTC GCC CGT AAG GGC GTC GAA GCG CAG CTC AGT GGG CCG CAG AAC S V I V A R K A V E A Q L S G P Q N	918
307	GGA GAC GCG CAC GCA CGG GGC GCG GTG CCG TTG GTC AGC CCG CCA TGC AAC TTC G D A H A R G A V P L V S P P C N F	972
325	TCC ACC AAG ATG GAG GCG AGC GCG CTT GAG AAG AGC GAG GAG CTG ACC GCC AAA S T K M E A S A L E K S E E L T A K	1026
	GAG CTG GCC TTT TGA TTG AAG AGT GCG CGT GGT CAT TCT GTC GCC TGC GAT CGT E L A F *	1080
	GGT AAC TTT CCT ACT CGT GTG TGT TTT GAT GTT TGT GCC TGT AAG AGT TAT GCT TCC GGC CTT GTG CTG TTA ATT TAC AGC CGT TAC ATG TAG TAC TTG TAT TTA TAC	1134
	CTG GAA TAA CGG TAT GTA ACA TAA ATA TTA GTG GGA TTT GAA GTG TAA TGC TAA ATA ATA AGA AAA CTT GAT GCA GAC ATT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA	1188
		1242

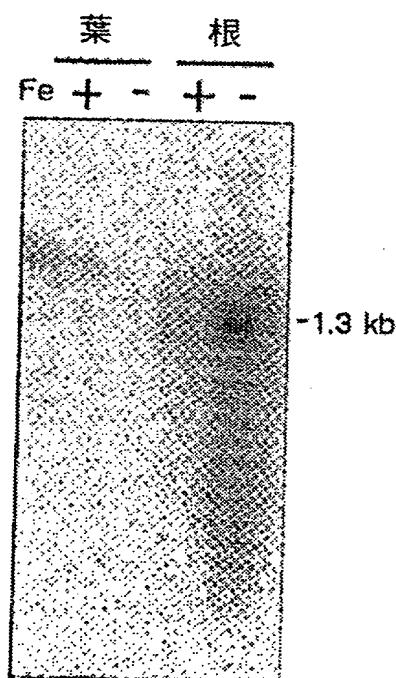
【図7】

【図8】



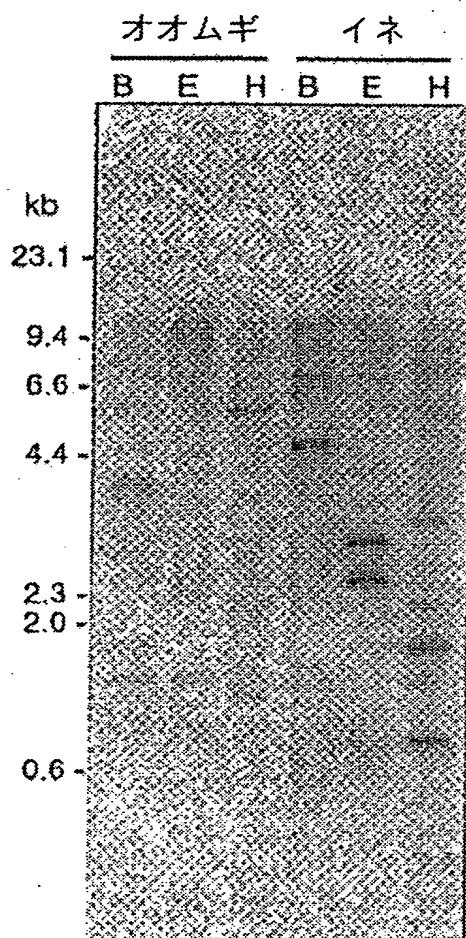
図面代用写真

【図9】



図面代用写真

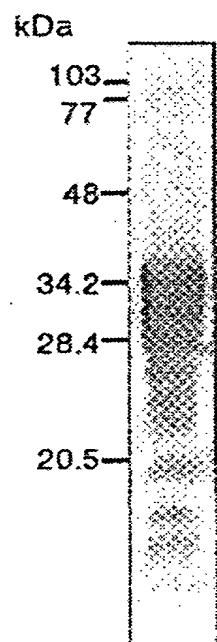
【図10】



図面代用写真

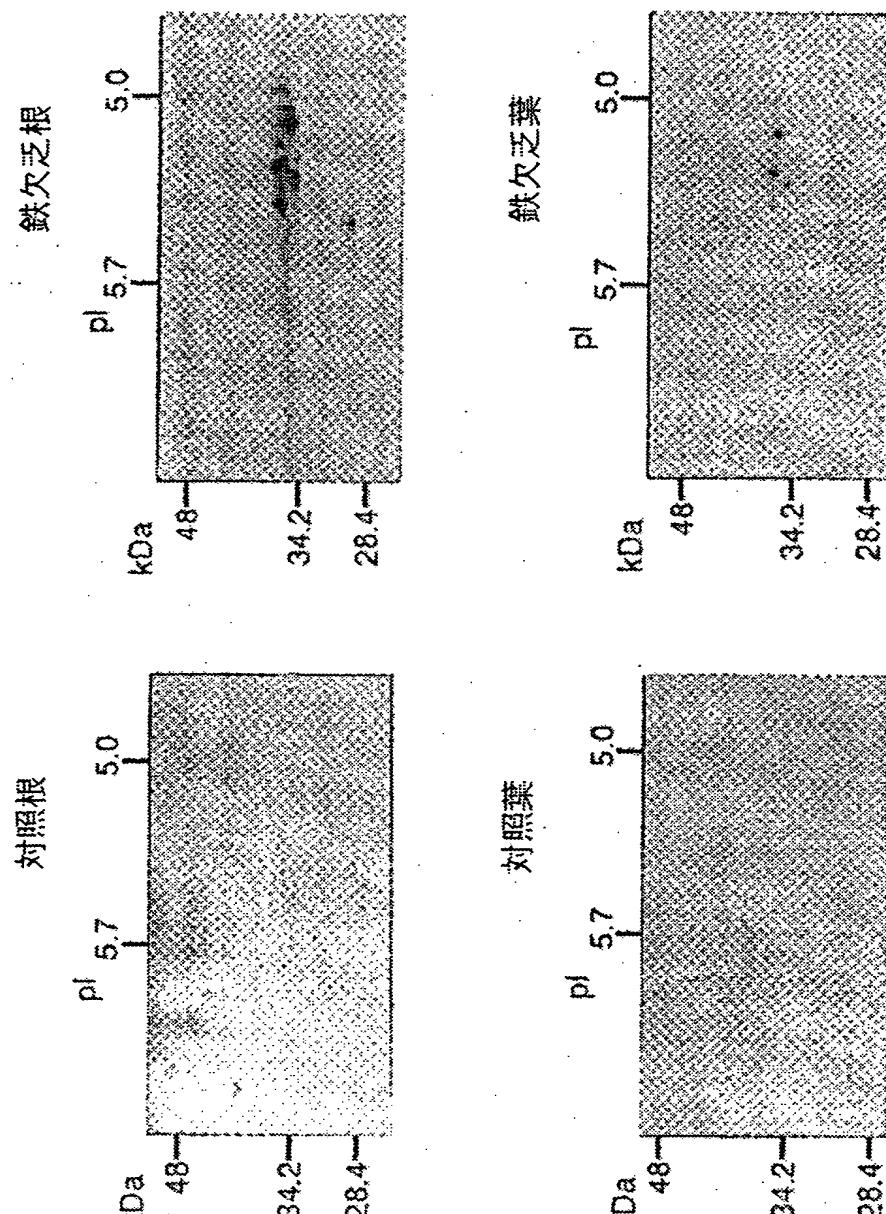
特平10-137685

【図11】



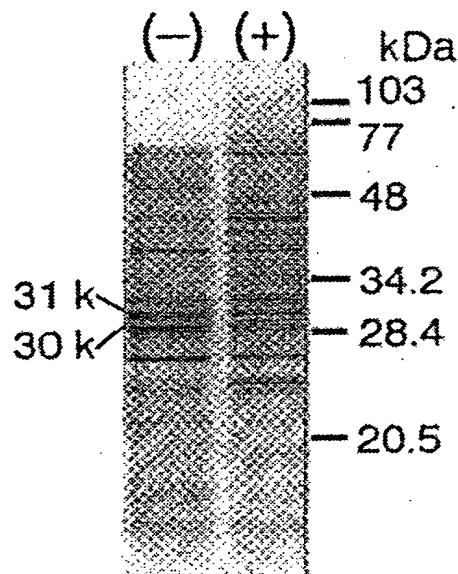
図面代用写真

【図12】



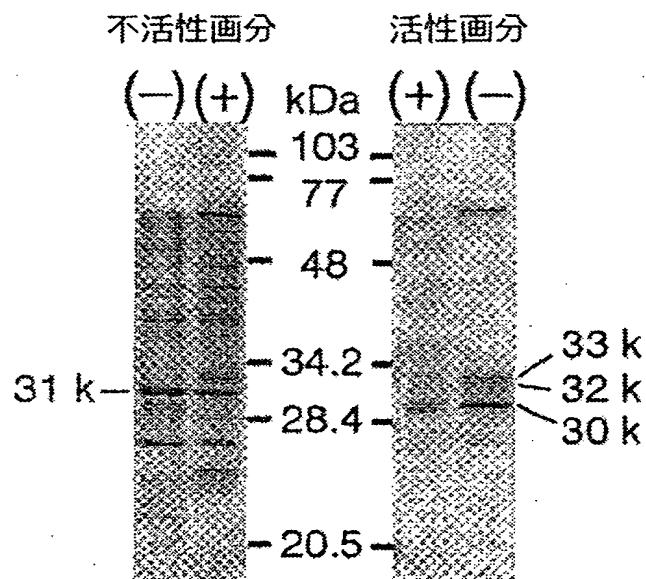
図面代用写真

【図13】



図面代用写真

【図14】



図面代用写真

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100102668
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9
階 たくみ特許事務所
【氏名又は名称】 佐伯 憲生

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団